

**EINFLUSS EINER AKUTEN GANZKÖRPERRÖNTGEN-
BESTRAHLUNG AUF DIE SEMIKONSERVATIVE UND
UNPROGRAMMIERTE (REPARATURBEDINGTE)
DESOXYRIBONUKLEINSÄURE-SYNTHESE VON
KNOCHENMARKSZELLEN DER RATTE NACH
FRAKTIONIERTER VORBESTRAHLUNG –
EIN BEITRAG ZUR STRAHLENHORMESIS**

GERRIT EHLING

Disbui, München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und
Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Prof.Dr. R. Schulz

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof.Dr. K. Tempel

EINFLUSS EINER AKUTEN GANZKÖRPERRÖNTGENBESTRAHLUNG AUF DIE
SEMIKONSERVATIVE UND UNPROGRAMMIERTE (REPARATURBEDINGTE)
DESOXYRIBONUKLEINSÄURE-SYNTHESE VON KNOCHENMARKSZELLEN
DER RATTE NACH FRAKTIONIERTER VORBESTRAHLUNG -
EIN BEITRAG ZUR STRAHLENHORMESIS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Gerrit Ehling
aus
Hamburg

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. K. Tempel

Korreferent: Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 24. Juli 1987

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

1.	Einleitung	1
2.	Die Bedeutung der Eltern	2
3.	Die Entwicklung des Kindes	3
4.	Die Rolle der Eltern	4
5.	Die Verantwortung der Eltern	5
6.	Die Beziehung zwischen Eltern und Kind	6
7.	Die Erziehung des Kindes	7
8.	Die Förderung des Kindes	8
9.	Die Unterstützung des Kindes	9
10.	Die Grenzen der Eltern	10
11.	Die Zusammenarbeit der Eltern	11
12.	Die Hilfe der Eltern	12
13.	Die Verantwortung der Eltern	13
14.	Die Beziehung zwischen Eltern und Kind	14
15.	Die Erziehung des Kindes	15
16.	Die Förderung des Kindes	16
17.	Die Unterstützung des Kindes	17
18.	Die Grenzen der Eltern	18
19.	Die Zusammenarbeit der Eltern	19
20.	Die Hilfe der Eltern	20
21.	Die Verantwortung der Eltern	21
22.	Die Beziehung zwischen Eltern und Kind	22
23.	Die Erziehung des Kindes	23
24.	Die Förderung des Kindes	24
25.	Die Unterstützung des Kindes	25
26.	Die Grenzen der Eltern	26
27.	Die Zusammenarbeit der Eltern	27
28.	Die Hilfe der Eltern	28
29.	Die Verantwortung der Eltern	29
30.	Die Beziehung zwischen Eltern und Kind	30
31.	Die Erziehung des Kindes	31
32.	Die Förderung des Kindes	32
33.	Die Unterstützung des Kindes	33
34.	Die Grenzen der Eltern	34
35.	Die Zusammenarbeit der Eltern	35
36.	Die Hilfe der Eltern	36
37.	Die Verantwortung der Eltern	37
38.	Die Beziehung zwischen Eltern und Kind	38
39.	Die Erziehung des Kindes	39
40.	Die Förderung des Kindes	40
41.	Die Unterstützung des Kindes	41
42.	Die Grenzen der Eltern	42
43.	Die Zusammenarbeit der Eltern	43
44.	Die Hilfe der Eltern	44
45.	Die Verantwortung der Eltern	45
46.	Die Beziehung zwischen Eltern und Kind	46
47.	Die Erziehung des Kindes	47
48.	Die Förderung des Kindes	48
49.	Die Unterstützung des Kindes	49
50.	Die Grenzen der Eltern	50
51.	Die Zusammenarbeit der Eltern	51
52.	Die Hilfe der Eltern	52
53.	Die Verantwortung der Eltern	53
54.	Die Beziehung zwischen Eltern und Kind	54
55.	Die Erziehung des Kindes	55
56.	Die Förderung des Kindes	56
57.	Die Unterstützung des Kindes	57
58.	Die Grenzen der Eltern	58
59.	Die Zusammenarbeit der Eltern	59
60.	Die Hilfe der Eltern	60
61.	Die Verantwortung der Eltern	61
62.	Die Beziehung zwischen Eltern und Kind	62
63.	Die Erziehung des Kindes	63
64.	Die Förderung des Kindes	64
65.	Die Unterstützung des Kindes	65
66.	Die Grenzen der Eltern	66
67.	Die Zusammenarbeit der Eltern	67
68.	Die Hilfe der Eltern	68
69.	Die Verantwortung der Eltern	69
70.	Die Beziehung zwischen Eltern und Kind	70
71.	Die Erziehung des Kindes	71
72.	Die Förderung des Kindes	72
73.	Die Unterstützung des Kindes	73
74.	Die Grenzen der Eltern	74
75.	Die Zusammenarbeit der Eltern	75
76.	Die Hilfe der Eltern	76
77.	Die Verantwortung der Eltern	77
78.	Die Beziehung zwischen Eltern und Kind	78
79.	Die Erziehung des Kindes	79
80.	Die Förderung des Kindes	80
81.	Die Unterstützung des Kindes	81
82.	Die Grenzen der Eltern	82
83.	Die Zusammenarbeit der Eltern	83
84.	Die Hilfe der Eltern	84
85.	Die Verantwortung der Eltern	85
86.	Die Beziehung zwischen Eltern und Kind	86
87.	Die Erziehung des Kindes	87
88.	Die Förderung des Kindes	88
89.	Die Unterstützung des Kindes	89
90.	Die Grenzen der Eltern	90
91.	Die Zusammenarbeit der Eltern	91
92.	Die Hilfe der Eltern	92
93.	Die Verantwortung der Eltern	93
94.	Die Beziehung zwischen Eltern und Kind	94
95.	Die Erziehung des Kindes	95
96.	Die Förderung des Kindes	96
97.	Die Unterstützung des Kindes	97
98.	Die Grenzen der Eltern	98
99.	Die Zusammenarbeit der Eltern	99
100.	Die Hilfe der Eltern	100

meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	PROBLEMSTELLUNG	
2.	EINLEITUNG	1
2.1.	<u>Biochemische Grundlagen</u>	1
2.2.	<u>Thymidin als DNS-Vorstufe</u>	6
2.3.	<u>Strahleninduzierte DNS-Schäden und ihre Reparatur</u>	8
2.4.	<u>DNS-Synthese nach Einwirkung ionisierender Strahlung</u>	14
2.5.	<u>Stimulierende Effekte durch ionisierende Strahlung, "Hormesis"</u>	18
2.5.1.	Einführung	18
2.5.2.	Hormesiseffekte durch Gammastrahlen	21
2.5.3.	Hormesiseffekte durch Röntgenstrahlen	23
2.5.4.	Weitere Hormesis-Arbeiten aus jüngster Zeit	25
3.	MATERIAL UND METHODIK	30
3.1.	<u>Reagentien</u>	30
3.2.	<u>Tiermaterial</u>	32
3.3.	<u>Versuchsmethoden</u>	32
3.3.1.	Bestrahlung	32
3.3.1.1.	In vivo-Bestrahlung	32
3.3.1.2.	In vitro-Bestrahlung	33
3.3.2.	Herstellen der Knochenmarkszellsuspension	34
3.3.3.	Bestimmung der Desoxyribonukleinsäuresynthese	35
3.3.3.1.	Semikonservative DNS-Synthese (SDS)	35
3.3.3.2.	Unprogrammierte DNS-Synthese (UDS)	37
3.3.4.	Isotopenverdünnungsanalyse	38

3.3.5.	Nukleoidsedimentation	39
3.3.5.1.	Prinzip	39
3.3.5.2.	Ausführung	40
3.3.6.	DNS-Konzentration	41
3.4.	<u>Statistische Auswertung</u>	41
4.	ERGEBNISSE	42
4.1.	<u>Versuche zur Methodik</u>	42
4.1.1.	Photometrische Messung der DNS-Konzentration	43
4.1.2.	Semikonservative DNS-Synthese (SDS); ³ H-dT-Einbau in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	44
4.1.3.	SDS; ³ H-dT-Einbau in Abhängigkeit von der ³ H-dT Konzentration	45
4.1.4.	SDS; Isotopenverdünnungsanalyse	46
4.1.5.	Unprogrammierte (reparaturbedingte) DNS-Synthese (UDS); UV-bedingte Stimulation nach vorheriger in vivo-Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy	47
4.2.	<u>Festlegen der Versuchsbedingungen</u>	48
4.2.1.	Semikonservative und unprogrammierte DNS-Synthese (SDS und UDS)	48
4.2.2.	Isotopenverdünnungsanalyse	48
4.2.3.	Bestrahlungsmodus	49
4.2.3.1.	In vivo-Bestrahlung	49
4.2.3.2.	In vitro-Bestrahlung	49
4.1.4.	Nukleoidsedimentation	50
4.3.	<u>In vitro-Versuche zur Charakterisierung der Zellen</u>	50
4.3.1.	In vitro-Versuche zur semikonservativen DNS-Synthese (SDS)	50
4.3.1.1.	Hydroxyharnstoff (HU)	50

4.3.1.2.	Novobiocin	52
4.3.1.3.	1- β -D-Arabinofuranosyl-Cytosin (ara-C)	53
4.3.1.4.	Hyperthermie	54
4.3.2.	In vitro-Versuche zur unprogrammierten (reparaturbedingten) DNS-Synthese (UDS)	55
4.3.2.1.	Novobiocin	55
4.3.2.2.	Nalidixinsäure	56
4.4.	<u>Strahlenexposition in vitro</u>	58
4.4.1.	Dosis-Wirkungs-Beziehung	58
4.4.2.	Röntgenbestrahlung in vitro und endogener Thymidinpool	59
4.5.	<u>Strahlenexposition in vivo</u>	62
4.5.1.	Einfluß einer akuten Einzelbestrahlung auf die semikonservative DNS-Synthese (SDS)	62
4.5.1.1.	Dosis-Wirkungs-Beziehung	62
4.5.1.2.	Einfluß der ^3H -dT-Markierungszeit auf die Dosis-Wirkungs-Beziehung	63
4.5.1.3.	Prozentuale Abweichung der semikonservativen DNS-Synthese (SDS) nach Bestrahlung von den Kontrollwerten	65
4.5.1.4.	Einfluß unmarkierten ("kalten") Thymidins auf den ^3H -dT-Einbau nach Bestrahlung	66
4.5.2	Einfluß fraktionierter Bestrahlung auf die semikonservative DNS-Synthese (SDS)	68
4.5.3.	Semikonservative und unprogrammierte DNS- Synthese (SDS und UDS) in Knochenmarks- zellen fraktioniert vorbestrahlter Ratten unter dem Einfluß einer Akut-Bestrahlung in vivo	69
4.5.3.1.	SDS; Vorversuche	69
4.5.3.2.	UDS; Vorversuche	72
4.5.3.3.	SDS und UDS; Hauptversuche	73
4.5.3.4.	Zusatzanalysen: Einfluß einiger Test- substanzen auf den durch fraktionierte Bestrahlung (3 Tage-Werte) veränderten ^3H -dT-Einbau	78

4.5.3.4.1.	SDS unter dem Einfluß kalten Thymidins (dT)	79
4.5.3.4.2.	SDS unter dem Einfluß von ara-C	80
4.5.3.4.3.	UDS unter dem Einfluß von Nalidixinsäure	82
4.5.3.4.4.	UDS unter dem Einfluß von Novobiocin	83
4.6.	<u>Nukleoidsedimentation</u>	84
4.6.1.	DNS-Schädigung in Abhängigkeit von der Strahlendosis	84
4.6.2.	Reparatur der DNS-Schäden in Abhängigkeit von der Nachinkubationszeit	86
4.6.3.	Einfluß einer in vitro-Akutbestrahlung auf die Reparaturkapazität von in vivo fraktioniert-vorbestrahlten Knochenmarkszellen	88
5.	DISKUSSION	90
5.1.	<u>Mögliche Ursachen der strahleninduzierten DNS-Synthese-Hemmung</u>	90
5.2.	<u>Beeinflussung der DNS-Synthese-Hemmung durch fraktionierte Bestrahlung</u>	95
5.2.1.	Eigene Untersuchungen	95
5.2.2.	Adaptiver Effekt als mögliche Ursache einer Änderung der Strahlenreaktion	95
5.2.2.1.	Verkleinerter dTTP-Pool?	95
5.2.2.2.	Der adaptive Effekt	98
5.2.2.3.	Dosimetrische Einordnung des Effekts	101
5.3.	<u>Schlußfolgerungen und Ausblick</u>	102
6.	ZUSAMMENFASSUNG	105
	SUMMARY	107
7.	LITERATURVERZEICHNIS	109
	Lebenslauf	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	-	Adenin
ADP	-	Adenosindiphosphat
AMP	-	Adenosinmonophosphat
ara-C	-	1- β -D-Arabinofuranosyl-Cytosin
AT	-	Ataxia teleangiectasia
ATP	-	Adenosintriphosphat
C/kg	-	Coulomb/kg (Ionendosiseinheit: 1 C/kg=3876 R)
C	-	Cytidin
CDP	-	Cytidindiphosphat
CHO-Zellen	-	Zellen des Chinesischen Hamsters
cpm	-	Impulse/min
CTP	-	Cytidintriphosphat
d	-	"desoxy"...
/d	-	pro Tag
D ₃₇ -Wert	-	Strahlendosis, die den Prozentsatz überlebender Einheiten auf 1/e=37% (e=Basis der natürlichen Logarithmen) herabsetzt.
dATP	-	Desoxyadenosintriphosphat
DE ₅₀	-	Dosismenge mit 50%iger Hemmwirkung
DNA	-	Deoxyribonucleic acid
DNS	-	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	-	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm	-	Zerfälle/min
DSB	-	Doppelstrangbruch
dT	-	Thymidin
G	-	Guanin
Glc6PDH	-	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase



GR	-	Glutathion-Reduktase
GSH	-	Glutathion
GSSG	-	oxidiertes Glutathion
GTP	-	Guanosintriphosphat
Gy	-	Gray (1 Gray = 100 rad)
HU	-	Hydroxyharnstoff
IAEA	-	International Atomic Energy Agency
kb	-	Kilobasen (=1000 Basen)
KG	-	Körpergewicht
LD ₅₀	-	50%ige Letalitäts-Dosis
m-RNS	-	messenger-RNS
NAD	-	Nikotinamidadenindinukleotid
NTP	-	Nukleosidtriphosphat
OEFS	-	Österreichisches Forschungszentrum Seibersdorf
PCA	-	Perchlorsäure
R	-	Röntgen
RNS	-	Ribonukleinsäure
RNR	-	Ribonukleotidreduktase
SCE	-	"Sister chromatid exchange"
SDS	-	semikonservative DNS-Synthese
SOD	-	Superoxid-Dismutase
SSB	-	Einzelstrangbruch
T	-	Thymin
U	-	Uridin
UMP	-	Uridinmonophosphat
UDS	-	unprogrammierte DNS-Synthese
UV	-	Ultraviolett-Licht
X-rays	-	Röntgenstrahlen
Y-rays	-	Gammastrahlen

PROBLEMSTELLUNG

Schon wenige Jahre nach Entdeckung der Röntgen- und Gamma-Strahlen (1895 bzw. 1896) wurde erstmals über biopositive Wirkungen, wie die Anregung des Wachstums von Pflanzen oder die Steigerung der Vitalität von Protozoen, berichtet. In einer 1980 veröffentlichten Monographie zitiert der amerikanische Strahlenbiologe T.D.LUCKEY mehr als 1250 Arbeiten, in denen über stimulierende Effekte von ionisierenden Strahlen berichtet wird. Diese Effekte werden mittlerweile unter dem -gleichfalls von LUCKEY geprägten - Begriff "Hormesis" (vom griechischen Wort "ὁρμίζω" = ich bewege, erregte" abgeleitet) zusammengefaßt.

Hormesis wurde inzwischen auch an Säugetieren, etwa an menschlichen Lymphozyten, beobachtet. Im Rahmen eines Forschungsprogramms über systemische Hormesiseffekte an der Ratte wurde vorliegend der Einfluß niedrig-dosierter fraktionierter Röntgenbestrahlung auf die Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Synthese von Knochenmarkszellen untersucht.

Orientierende bzw. ergänzende Analysen hatten die Strahlenreaktion der DNS-Synthese von Knochenmarkszellen überhaupt, ihre Reaktion auf Hemmstoffe der DNS-Synthese bzw. der DNS-Reparatur sowie das Verhalten der DNS-Reparatur unter "Hormesisbedingungen" zum Gegenstand.

2. EINLEITUNG

Um ein besseres Verständnis der vorliegenden Arbeit zu gewährleisten, seien zunächst einige Hinweise zur Biochemie der Erbsubstanz sowie zur Wirkung ionisierender Strahlung auf die DNS-Synthese und ihre Reparatur erlaubt. Im Anschluß daran wird auf stimulierende Effekte ionisierender Strahlen (Hormesis) eingegangen.

2.1. Biochemische Grundlagen

(Übersichten siehe unter Ziffer 2, 25, 29, 42, 58, 61, 82 und 117 des Literaturverzeichnisses.)

Die genetische Information des Organismus ist in der DNS als Sequenz ihrer Purinbasen Adenin und Guanin, sowie der Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin gespeichert.

Die nach außen gerichteten negativen Phosphatbrücken (Abb.2.1.), die die einzelnen Desoxyribonukleotide verbinden, bilden zwei spiralig umeinander gewundene Polynukleotidstränge ("Doppelhelix"), deren nach innen gerichtete, räumlich zueinander passende komplementäre Basen (Adenin-Thymin, Guanin-Cytosin) über spezifisch angeordnete Wasserstoffbrücken untereinander in Beziehung treten. Die Zuckermoleküle dieses Doppelstrangs sind um 180° gegeneinander verdreht angeordnet und gegensätzlich "polarisiert" (Strang A: Phosphatbrücken in 3',5'Richtung, Strang B in 5',3'-Richtung), was die "Ablesbarkeit" der DNS für die Replikation und Transkription erschwert.

Die komplementäre Struktur der DNS ermöglicht ihre identische

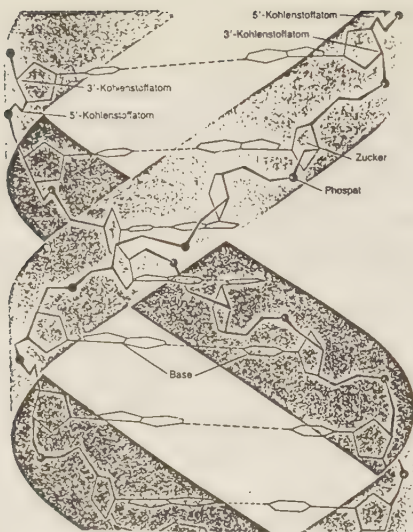


Abb.2.1.:

Die Doppelhelix besteht aus zwei gegenläufigen DNS-Strängen, die sich in einer rechtshändigen Spirale umeinander wickeln. Das der Außenseite zugewandte Rückgrat eines Strangs bilden Zucker- und Phosphatgruppen, die kovalent miteinander verbunden sind. An jeder Zuckereinheit hängt eine von vier Nukleotidbasen, von denen Adenin (A) mit Thymin (T) sowie Guanin (G) mit Cytosin über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Weiters siehe Text.
(von J.C. Wang 1985, 117)

Replikation vor jeder Zellteilung. Diese ist semikonservativ d.h., beide DNS-Mutterstränge dienen als Matrize für die Neusynthese zweier Tochterstränge. Eine derartige Verdopplung von DNS-Molekülen ist Voraussetzung für die Weitergabe genetischer Informationen.

Die Doppelhelix liegt in vivo überwiegend in der sog. B-Konfiguration vor, d.h., ca. 10,5 Basenpaare bilden eine vollständige rechtshändige Windung, wobei lokale Schwankungen in der Höhe des Drehwinkels zum Teil erheblich sind (15°).

Durch Einkristall-Röntgenstrukturanalyse konnte festgestellt werden, daß unter dem Einfluß bestimmter Kräfte die rechtshändige DNS mit einer Purin-Pyrimidinwechselfolge (G-C,G-C) in die linkshändige sog. Z-Form übergehen kann (ca. 1%)(61).

Damit sollten u.a. das Ablesen der die Transkription kontrollierenden Repressor- und Regulatorgene erleichtert und eine Überspiralisierung geschlossener DNS-Ringe verhindert werden. Auch könnten die o.g. strukturellen Fluktuationen die Erkennung von DNS-Basen-Sequenzen beeinflussen (29).

Die DNS ist von einer Eiweißhülle, dem sog. Chromatin, umgeben; Chromatin besteht aus den Proteinfractionen basischer Histone und saurer Nüchthistone und bildet mit der DNS eine funktionelle Einheit. Doppelhelixabschnitte wickeln sich in $1\frac{3}{4}$ Windungen um oktamere Histonpakete, bestehend aus den Histonen 2A, 2B, 3 und 4. Diese sogen. Nukleosomen ("Core-DNA") sind über Verbindungsstücke ("Linker"), bestehend aus ca. 20 Basenpaaren, die an ein Histon 1 gekoppelt sind, untereinander verbunden (Abb.2.1.a). Oktamere und Linker sind für die weitere Aufwicklung der DNS zur Superhelix und zum Solenoid verantwortlich. Hier werden weitere Regulationsfaktoren für die Steuerung der Genexpression vermutet (61 u.a.).

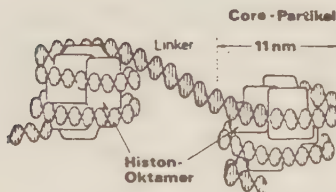


Abb.2.1.a:

Struktur der Nukleosomen (schematisch).
Um das Bündel der Histone ist die Doppelhelix der DNS eindreiviertel mal herumgeschlungen.
(aus Karlson 1984)

Dazu gehören auch die als DNS-Topoisomerasen bezeichneten Enzyme, die die Replikations- und Transkriptionsfähigkeit der DNS dadurch beeinflussen, daß sie diese in andere topologische Formen überführen. Nach Spaltung eines- (Typ I) bzw. beider DNS Stränge (Typ II) (Exonukleasefunktion) wird die DNS "überspiralisiert", was die Transkription erleichtern soll und beim fortlaufenden Entwinden der Stränge während der Replikation notwendig ist (117 u.a.).

Die semikonservative Replikation der DNS startet an mehreren tausend Initiationspunkten gleichzeitig. Hier beginnen die Topoisomerasen vom Typ II (=Gyrase) damit, beide Stränge zu öffnen und unter Adenosintri-phosphat(ATP)-Verbrauch zu ent-

spiralisieren. Spezifische Initiationfaktoren, die ihre Initiationspunkte ("Origins") (41) erkannt haben, ermöglichen die dortige Anlagerung einer RNS-Polymerase, die ihrerseits ein RNS-Startermolekül ("Primer") in 5',3' -Richtung synthetisiert. An dem 3'-Hydroxy-Ende werden dann durch die Polymerase I, die nur an einem Ribonukleotid-Startermolekül weitere Nukleotide synthetisieren kann, fortschreitend DNS-Stücke bis zu 1000 Basen Länge synthetisiert, die als OKAZAKI-Abschnitte bezeichnet werden. Dabei entstehen einzelne replizierte Schleifen, die zusammenlaufen, sodaß sich letztendlich die gesamte DNS verdoppelt hat. Die Primer-RNS wird nun hydrolytisch über die RNase H abgespalten; die Lücken zwischen den neu synthetisierten DNS-Stücken werden mit Nukleotiden gefüllt. Da die Polymerase I gleichzeitig Exonukleaseaktivität besitzt, ist sie in der Lage, die von ihr synthetisierten DNS-Abschnitte zu kontrollieren und fehlerhafte Stellen zu beseitigen (67). Abschließend besorgen DNS-Ligasen die Verknüpfung der einzelnen Abschnitte.

Zu den biochemischen Voraussetzungen für einen ordnungsgemäßen Ablauf der DNS-Replikation gehört neben den o.a. Enzymsystemen der DNS-Vorstufenpool, der durch de novo-Synthese oder Wiederverwendung gebrauchter Nukleotidbausteine kontinuierlich aufgefüllt wird. Eine Übersicht über die Synthese der Nukleotide und ihre Phosphorylierung zu Nukleosidtriphosphaten (NTP) -bestehend aus Adenosintriphosphat (ATP), Cytidintriphosphat (CTP), Guanosintriphosphat (GTP) und Thymidintriphosphat (dTTP)- gibt Abb.2.1.b. Die Reduktion zu Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) erfolgt bei Eukaryonten auf der Diphosphatstufe (25 u.a.) mit Hilfe der Ribonukleotidreduktase, einem Enzym, das in der S-Phase induziert wird (11).

Der dNTP-Pool wird über diese- möglicherweise die DNS-Synthese limitierende (17)- Ribonukleotidreduktase (RNR) reguliert (11,103), die ihrerseits einer allosterischen Regulation durch die von ihr synthetisierten Desoxyribonukleotide unterliegt (25,42). Dieser "negative feedback"-Mechanismus ermöglicht eine ständige Kontrolle der dNTP-Konzentrationen. Sein Pool ist in der S-Phase am größten(103), wobei dTTP den größten, dGTP den kleinsten Pool darstellt (11) . Unausgeglichene dNTP-Pools korrelieren mit der DNS-Synthese-Hemmung (103); dabei bildet der kleinste Pool (dGTP) den sie limitierenden Faktor.

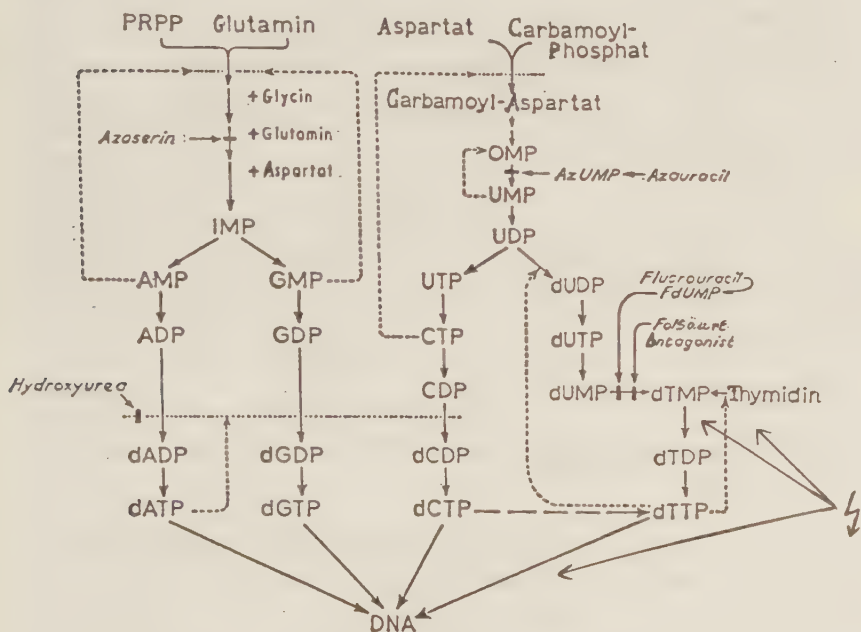


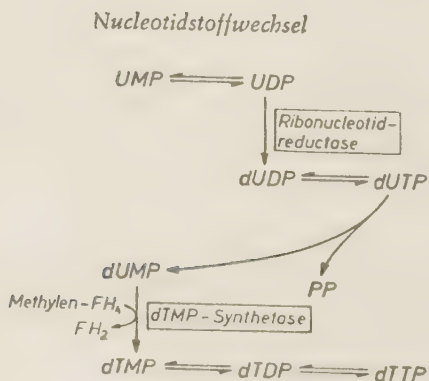
Abb.2.1.b.:

Schematische Darstellung der Biosynthese von Desoxyribonukleosid-Triphosphaten.

"Feed-back"-Mechanismen sind durch unterbrochene Linien gekennzeichnet. Die dunklen Pfeile kennzeichnen die verschiedenen Angriffspunkte durch ionisierende Strahlung und einige Antimetabolite auf die Reaktionsschritte (aus Davidson 1976).

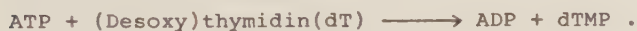
2.2. Thymidin als DNS-Vorstufe

Thymidin ist als DNS-Vorstufe insofern "einmalig", als es weder zu seinem Pyrimidinribonukleosid oxidiert noch in andere Pyrimidin oder Purinbasen umgewandelt werden kann. Nicht benötigtes Desoxythymidin wird nach Dephosphorylierung von Desoxythymidinmonophosphat (dTMP)(71) oder nach Kernzerfall in den Extrazellularraum freigesetzt (90), im Kreislauf zu Thymin umgesetzt und in der Leber weiter abgebaut (71). Umgekehrt ist die Bildung von Desoxythymidin aus freiem Thymin mittels Desoxyribosyltransfer von Desoxyuridin durch Thymidinphosphorylase (EC 2.4.2.4.) möglich (71). Der de novo Syntheseweg von dTMP wird unter Normalbedingungen als dominant und physiologisch bedeutsamer (71) betrachtet. Er verläuft über die Methylierung von Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) zu Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) unter dem Einfluß der Thymidylatsynthetase (25), wobei die Methylgruppe von der Methyltetrahydrofolsäure geliefert wird. Sie ist durch Folsäureanaloge wie Aminopterin blockierbar (25,42). Den genauen Ablauf zeigt Abb.2.2.: (aus Harbers 1975)



Reaktionsfolge
bei der Bildung von Desoxythymidinphosphaten.
 FH_4 = Tetrahydrofolsäure;
 FH_2 = Dihydrofolsäure;
PP = Pyrophosphat.

dTMP wird anschließend mit Hilfe von Mono- und Diphosphatkinasen zu (Desoxy)thymidintriphosphat (dTTP) phosphoryliert. Den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Wiederverwertung von Thymidin ("preformed pathway") bewerkstelligt die Thymidinkinase(88), die das Schlüsselenzym für die Phosphorylierung von Thymidin zu dTTP darstellt. (Die Mono- und Diphosphatkinasen zeigen keine Angriffspunkte für allosterische Kontrollen (71). Thymidinkinase katalysiert unter ATP-Verbrauch folgende Reaktion:



Die mit der Proliferation korrelierte Thymidinkinaseaktivität ist besonders hoch in DNS-synthetisierenden Zellen (50), wie z.B. in Knochenmarkszellen. Ihr Anstieg beginnt in der späten G1-Phase und bleibt zu Beginn der S-Phase bestehen (46). Ihre im Zellteilungsverlauf periodische Aktivität wird auf eine erhöhte Beschleunigung der Synthese der für sie kodierenden m-RNS zurückgeführt (8).

Thymidin (dT) induziert die Thymidinkinasesynthese auf der Transkriptionsebene (101). Die Feinregulation ihrer Aktivität erfolgt durch isoenzymatische Umlagerung in Gegenwart von Effektoren , wodurch dem Enzym eine Schlüsselrolle bei der intrazellulären Anreicherung von Thymidin in phosphorylierter Form zukommt (71).

Ein Überschuß an dTTP hemmt seinerseits die Thymidinkinase, die Reduktion von CDP(UDP-CDP-Reduktasehemmung) sowie die dCMP-Desaminase , ohne die Nukleotidphosphatkinasen zu beeinflussen, wodurch ein Akkumulieren von dTTP verhindert wird (25). Es sind zwei verschiedene Transportsysteme für Thymidin bekannt (113). Ein als "low-affinity-System" bezeichneter Vor-

gang, der einer erleichterten Diffusion gleichkommt, kann als gemeinsamer Transportweg für alle Nukleoside betrachtet werden. Diesem sättigbaren Prozeß steht ein "high-affinity-System" mit enger Substratspezifität gegenüber, daß vermutlich einen aktiven Carrierprozeß mit konzentrativer Wirkung darstellt (113). Aufgrund sofortiger Phosphorylierung wird die intrazelluläre Konzentration freien Thymidins sehr gering gehalten (88).

2.3. Strahleninduzierte Schäden an der DNS und ihre Reparatur

(Übersichten siehe unter Ziffer 15, 17, 30, 38, 41, 67, 68, 93, 95 und 104 des Literaturverzeichnisses).

Abb.2.3.1. verdeutlicht die drei Hauptangriffspunkte ionisierender Strahlung an der DNS, die zu Basenschädigung, DNS-Verschmelzungen (sogen. Cross links) sowie Einzel- und Doppelstrangbrüchen führen können. Die Häufigkeit dieser Schäden nimmt mit der biologischen Wirksamkeit als Funktion der Fähigkeit zur Energieübertragung, ausgedrückt im "Linearen Energietransfer" (LET)* der Strahlung, zu. Dabei erfolgt die Energieübertragung entweder direkt auf die DNS-Moleküle oder indirekt über die Bildung angeregter Moleküle und freier Radikale(wie z.B. OH[•]) in wässriger Lösung, die ihrerseits mit der DNS reagieren, wobei Sauerstoff strahlensensibilisierend, Ozon hingegen radioprotektiv wirkt (43). Man geht heute davon aus, daß die DNS einer umweltbedingten kontinuierlichen Schädigung durch Chemikalien, UV-Licht und/-

* LET : Darunter versteht man den Energieverlust eines Teilchens oder Quants je Wegelement der Teilchen- bzw. Quantenbahn.

oder ionisierender Strahlung unterworfen ist. Um die Integrität des genetischen Codes sicherzustellen, muß die Zelle somit einen Teil ihrer Energie für die enzymatische Reparatur dieser Schäden zur Verfügung stellen.

Einzelstrangbrüche (SSB's) können durch Trennung der Phosphatdiesterbindungen, durch Auflösung der C-C-Bindung im Zucker und/oder durch Sprengung der Sauerstoffbrücke im Zucker entstehen. Ihre Anzahl steigt linear mit der Höhe der Strahlendosis im Intervall von 0,2 - 60.000 Gy; mindestens 10-20 eV sind zu ihrer Induktion erforderlich (17).

Die Reparatur erfolgt nach dem Excisionsprinzip und verläuft bei den Säugetierzellen biphasisch, d.h., 60 % der Schäden werden nach Exposition mit 0,5-4 Gy sehr rasch (Halbwertszeit $t_{1/2} = 2$ min), nach Exposition mit 20-150 Gy rasch ($t_{1/2} = 5$ min) repariert, während die übrigen 40 % eine Halbwertszeit von 15 min aufweisen (17, 95). Man vermutet, daß die Reparatur der Schäden in der nukleosomalen "Core-DNA" aufgrund ihrer schlechteren Zugänglichkeit für die Enzyme länger dauert als in der gut zugänglichen "Linker DNA" (38, 77, 95 u. a.).

Doppelstrangbrüche (DSB's) entstehen entweder durch ein einziges Ionisationsereignis oder durch die Koinzidenz zweier einander gegenüberliegender SSB's. Die meisten Autoren sind der Ansicht, daß die Anzahl der DSB's bei kleinen Dosen linear, bei höheren Dosen jedoch quadratisch zunimmt, was als Folge einer mangelnden Reparaturkapazität interpretiert wird (17 u.a.). Nach unseren gegenwärtigen Kenntnissen kann davon ausgegangen werden, daß DSB's auch in Säugetierzellen repariert werden können, daß die Reparatur jedoch fehlerhaft und rela-

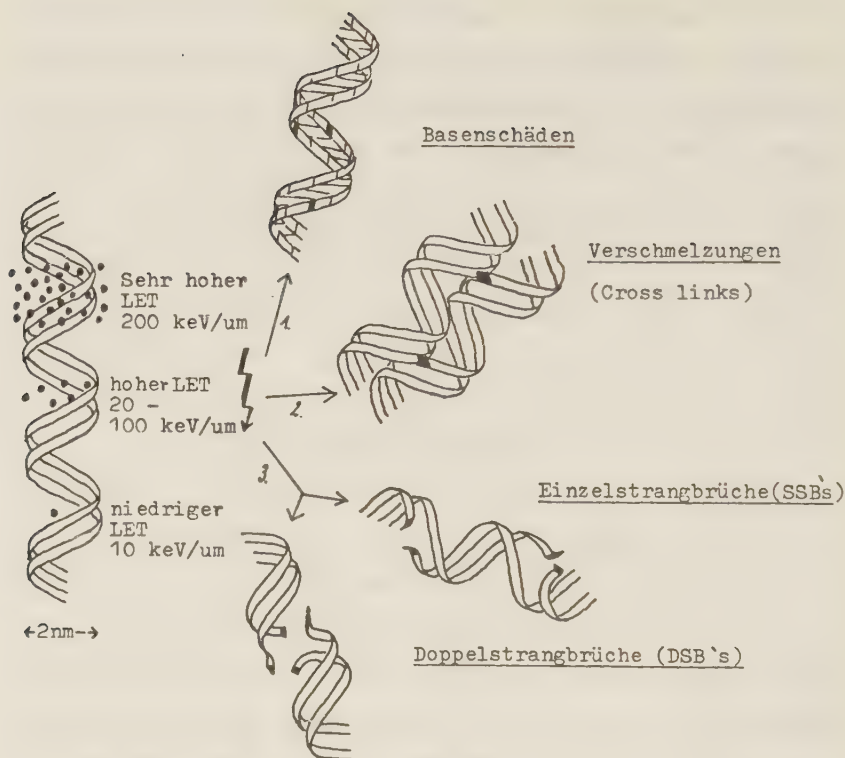


Abb.2.3.1.:

Realative Verteilung der Ionisationen nach Einwirkung von hoher und niedriger LET-Strahlung sowie die durch sie entstehenden DNS-Schäden.
(modifiziert nach Coogle, 1983)

tiv langsam verläuft ($t_{1/2}$ für die ersten 50%: 10-40 min, für den Rest 1,5-7 h, bei Dosen von 50-100 Gy). Van der Schans et al. (95) z.B. ermittelten nach Strahlenexposition von Zellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) 36 DSB's pro ein Gy. DNA-Basenschäden steigen gleichfalls proportional zur Dosis an und entstehen wie die Einzelstrangbrüche nach Interaktion mit wässrigen freien Radikalen ($\text{OH}^\cdot$, $\text{HO}_2^\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$). Sie werden rasch

durch Basenexcision repariert, wobei nichterfolgte Reparatur (nach etwa 2 h) als Zeichen eines potentiell letalen Strahlenschadens angesehen wird (17).

Hinsichtlich der Reparaturmechanismen in Säugetierzellen unterscheidet man die lichtabhängige "Photoreparatur" von der Dunkelreparatur. Die Photoreparatur beseitigt nur UV-Schäden (Pyrimidindimere)(67). Hierbei bildet ein Enzym, die Photolyase, einen Komplex mit dem erkannten UV-induzierten Pyrimidindimer und monomerisiert es nach Absorption von Licht (Sutherland 1974, in 68).

Die Dunkelreparaturmechanismen unterteilt Friedberg (38) in

A.Umkehrbare Schäden, dazu gehören

1. die Dealkylierung von DNS-Basen (z.B. O^6 -Methylguanin) durch eine Methyltransferase (Senkung der Mutationsrate)
2. die direkte Ligation von SSB's mit Hilfe einer Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)-abhängigen Ligase.

B.Excision der Schäden, dazu gehören

1. die Basenexcision durch Glycosylasen mit/oder ohne basenfreie Stellen-erkennende "Apurin-Apyrimidin"(AP)-Endonukleasen
2. Nukleotidexcision über Endonukleasen.

C.Strahleninduzierte Schäden, die nicht bis zurnächsten Replikation repariert werden konnten oder toleriert wurden (38), werden im Verlauf der DNS-Synthese durch die Rekombinationsreparatur beseitigt (68).

Der enzymatische Ablauf der Reparaturmechanismen ist in Abb. 2.3.2. zusammenfassend dargestellt.

Neben den in Abb.2.3.2. genannten Enzymen wurde für die Rekombinationsreparatur die Beteiligung weiterer Enzymprote-

A: DEALKYLIERUNG VON DNA-BASEN und DIREKTE LIGATION VON SSBs

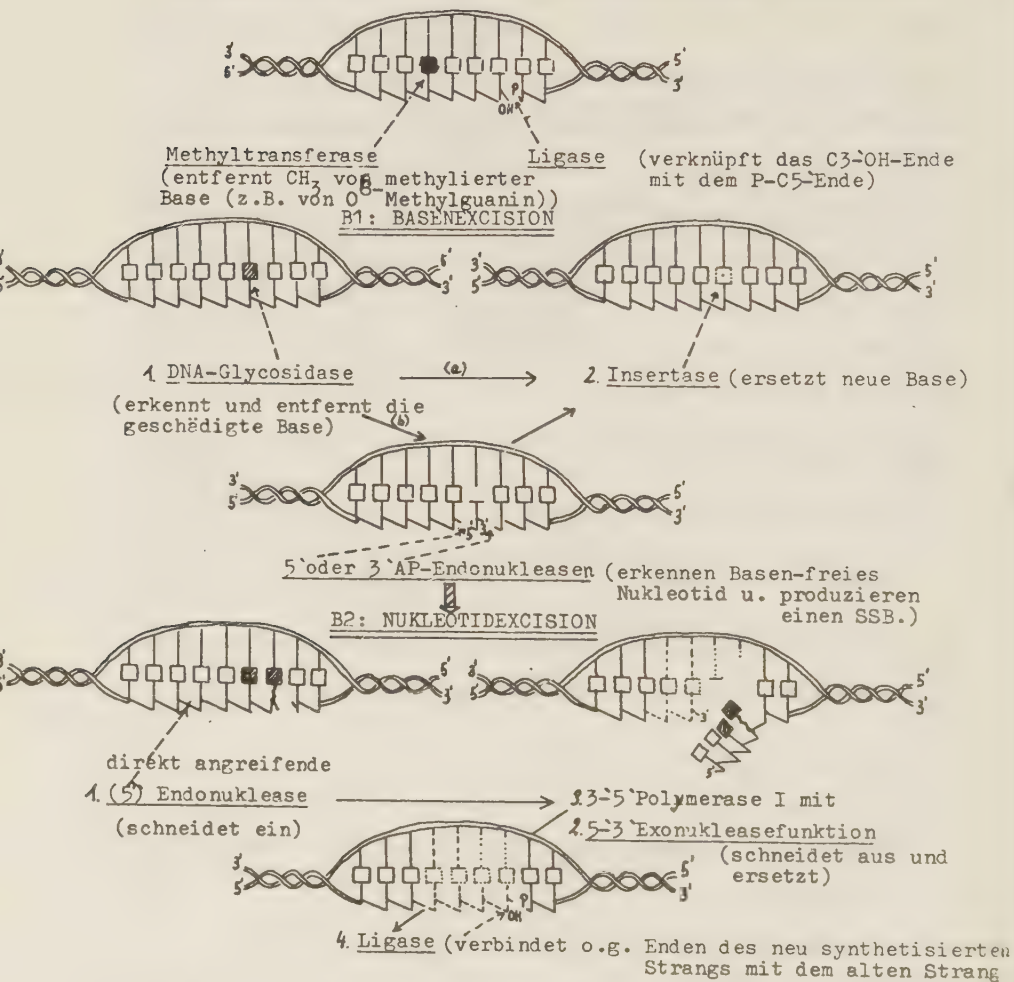


Abb.2.3.2.:

Schematische Darstellung der wichtigsten präreplikativen Reparaturmechanismen in Säugetierzellen. Basenexcision und Nukleotid-excision können über die spezifisch angreifenden Apurinic-Apyrimidinic-sites (AP)-Endonukleasen zusammenarbeiten, da diese in der Lage sind, basenfreie Nukleotide zu erkennen und einen Strangbruch zu verursachen. Die weitere Reparatur verläuft dann über die Nukleotidexcision. Die Polymerase I füllt die vorher herausgeschnittene Nukleotidlücke mit zur Matrize komplementären Nukleotiden nur, wenn ihr ein "primer" mit 3'-OH-terminus zur Verfügung steht.

(modifiziert nach Laskowski, 1981 und Friedberg, 1985)

ine festgestellt (bei E.Coli!), deren Zusammenspiel noch weitgehend unbekannt ist. Diese als recA...bis recL und LexA (68) bzw. als uvrA-D (38) bezeichneten Proteine scheinen auch in Säugertierzellen eine Rolle zu spielen, wie der jüngst erfolgte Nachweis des recA-Proteins in der Ratte vermuten läßt(68 u.a.).

Eine besondere Form der Rekombinationsreparatur ist die SOS-Reparatur, die-wie die unter A1 genannte Dealkylierung-induzierbar ist. Diese Enzyminduktion verläuft etwa folgendermaßen (38,68): Anwesende recA-Proteine sind nach Anheftung an den strahleninduzierten Einzelstranglücken in der Lage, den die an der SOS-Reparatur beteiligten Gene blockierenden LexA-Repressor zu spalten, sodaß die Synthese der beteiligten Enzyme nach Expression der nun freien Gene solange anhält, bis die Einzelstranglücken repariert sind und das recA-Protein seine Proteaseaktivität wieder verloren hat (Flanders, 1981,in 38)

Zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen liegen bisher nur Modellvorstellungen vor.

Nach dem von COGGLE 1983 (17) beschriebenen theoretischen Schema soll die Reparatur der DSB's postreplikativ anhand ungeschädigter homologer DNS-Stränge ablaufen.

Zuerst werden bei beiden Doppelsträngen jeweils einige Nukleotide eines Stranges entfernt (Endo-und Exonuklease) .

Nun legt sich der jeweils längere Strang an den homologen Abschnitt des ungeschädigten, jedoch zuvor an geeigneter Stelle inzidierten Doppelstrang an . Die sich anschließende Rekombinationsreparatur erfolgt wie in Abb.2.3.2. beschrieben.

Die nach der Rekombination verbliebenen zwei Einschnitte

werden durch eine Ligase verbunden, die Lücken mit Nukleotiden aufgefüllt (Polymerase).

Dieses Modell hat den Nachteil, daß es die vor der Replikation entstandenen Doppelstrangbrüche unberücksichtigt läßt.

Von SANDERSON und MORLEY, 1986, (93) wird ein einfacheres Modell vorgeschlagen, bei dem DSB's die Bildung eines DNS-bindenden Proteins induzieren, das in der Lage sein soll, die Stränge solange zusammenzuhalten, bis die Ligation erfolgt ist. Da dieses postulierte System strahlenbedingte Letaleffekte nicht beeinflußt, scheint es vom SOS-Repairsystem verschieden zu sein (93).

GIACCIA et al. (1983) (39) vermuten 2 voneinander unabhängige Wege für die Reparatur von DSB's, nachdem der erste in der späten S-Phase, der zweite in den übrigen Phasen wirksam ist.

2.4. DNS-Synthese nach Einwirkung ionisierender Strahlung

Bereits 1906 wurde ein Grundgesetz der Strahlenbiologie formuliert. Es besagt: "Die Strahlenempfindlichkeit einer Zelle verhält sich proportional zu ihrer Teilungsaktivität und umgekehrt proportional zu ihrem Differenzierungsgrad." (Gesetz von BERGONIE und TRIBONDEAU) (104). Die Ursachen der besonderen Strahlenempfindlichkeit teilungsaktiver Zellen konnten bis heute noch nicht in allen Einzelheiten geklärt werden. Eine zentrale Rolle spielt dabei zweifellos die DNS.

1942 entdeckten EULER und Von HEVESY, daß der ³²P-Einbau in die DNS nach Bestrahlung erniedrigt war. Seitdem ist die DNS-Synthese als strahlensensibler Vorgang bekannt und nach wie vor Gegenstand von Untersuchungen. Aus der einschlägigen, ihrem Umfang nach kaum mehr überschaubaren Literatur ergibt

sich u. a., daß die Dosis-Wirkungskurve der strahleninduzierten Hemmung der DNS-Synthese aus 2 Komponenten besteht, einer bei kleinen Dosen (D : über 5 Gy) steilen Komponente, und einer flacher verlaufenden Komponente bei höheren Strahlendosen (D : über 100 Gy) (86). Nach dem gegenwärtigen u.a. von PAINTER 1986 (86) zusammengefaßten Wissenstand sind die steile Komponente der strahleninduzierten Hemmung der Initiation zur Replikation der einzelnen DNS-Verdopplungsabschnitte ("Replicons"), die flache Komponente der Hemmung der Kettenverlängerung (Elongation) in den einzelnen Replikationseinheiten zuzuordnen (MAKINO und OKADA, WALTERS und HILDEBRAND 1975, PAINTER/YOUNG 1976, WATANABE 1974, DAHLE 1979, OCKEY 1983*). Der molekulare Mechanismus dieser Strahleneffekte konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Versuche mit Bromdesoxyuridineinbau (BrdUrd) und nachfolgender Bestrahlung mit UV-Licht (POVIRK und PAINTER 1976) beispielsweise zeigten, daß das Zentrum der Replicon-Initiationshemmung in der DNS liegen muß. Hierbei wurden HeLa-Zellen und Zellen des Chinesischen Hamsters mit BrdUrd inkubiert, was zu einem etwa 20%igen Ersatz des Thymins durch Bromuracil in einem Strang der DNS führte. Anschließend wurden die Zellen mit 313 nm Licht bestrahlt. Dabei traten Strangbrüche in BrdUrd-substituierten Zellen 100-1000 mal häufiger auf als in unbehandelten (LEY und SETLOW 1972). Das Ergebnis war eine Initiationsreplikationshemmung nur in den mit BrdUrd-behandelten Zellen, und zwar nur in den Genabschnitten, in denen Thymin durch Brom-Uracil ersetzt worden war (POVIRK 1977). Da sich der Umfang der Hemmung auf

* Alle nicht bezifferten Autoren sind bei PAINTER in Ziffer 86 des Literaturverzeichnisses aufgeführt.

mehr als eine Länge von 1000 Kilobasen(Kb) erstreckte, die Durchschnittsgröße eines Replicons jedoch nur 50 Kb beträgt, wurde die gleichzeitige Hemmung einer ganzen Gruppe von Replicons (Cluster) angenommen (PAINTER,YOUNG 1976). Vermutungen,der Hemmechanismus läge in der Entspannung der durch nukleosomale Interaktionen bedingten DNS-Überdrillung infolge von Strangbrüchen (PAINTER 1978) konnten nicht bestätigt werden (Sinden et al., 1980).

Versuche mit strahlensensiblen A-T-Zellen (Zellen menschlicher Patienten, die an der Erbkrankheit Ataxia teleangiectasia u.a. mit dem Symptom einer Kleinhirnatrophie homozygot rezessiv erkrankt sind) zeigen, daß diese eine bis in den Dosisbereich von 50 Gy(Painter,1983) strahlenresistente DNS-Synthese aufweisen (HOULDSWORTH,LAVIN 1980 u.a.),Abb.2.4.1.b.Nach PAINTER und YOUNG(1980) sowie OCKEY (1983) ist dies auf eine selektivstrahlenresistente DNS-Kettenverlängerung zurückzuführen; die gleichzeitige Initiationshemmung betrifft jeweils nur ein Replicon und nicht die ganze Gruppe von Replikationseinheiten. Das Fehlen eines Faktors, der in normalen Zellen die Replicon-Initiation koordinativ zu einem"Cluster"zusammenschließt, könnte hierfür eine Erklärung sein (86).

Die in diesem Zusammenhang von EDWARDS und TAYLOR 1980, geäußerte Vermutung, bei dem Faktor könne es sich um die Poly(ADP)-Ribose-Synthese (darunter versteht man die Verknüpfung vieler (ADP)-Ribose-Moleküle, die am Chromatin gebunden sind, mit der Aufgabe, die Ligase zu aktivieren (16))- handeln, konnten mit Hilfe von Hemmstofftests (3-Aminobenzamid) (JANES, LEHMANN 1982,PAINTER 1985) sowie mit Versuchen an A-T-Zellen (Zwelling et al.1983) ausgeschlossen werden. Der somit noch unbekannte Faktor soll auch die Aufgabe haben, die

vorrückende Replikationsgabel anzuhalten, bevor diese auf eine strahlenbedingte Läsion trifft (86).

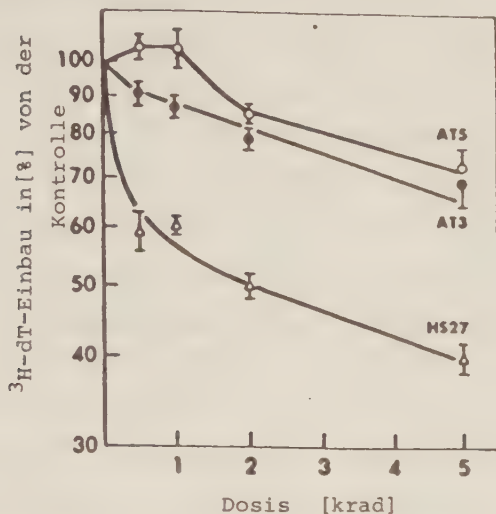


Abb.2.4.1.:

Dosis-Wirkungs-Beziehung zur in vitro-Akutbestrahlung a) von menschlichen Lymphozyten b) von Zellen menschlicher Patienten, die an der Erbkrankheit Ataxia teleangiectasia homozygot rezessiv erkrankt sind (2 verschiedene Typen: AT5 und AT3) (aus PAINTER, 1986).

JEGGO u.KEMP z.B. (56) stellten 1983 fest, daß in Zellmutanten des Chinesischen Hamsters, denen die Fähigkeit zur Doppelstrangbruchreparatur fehlt, die DNS-Synthese durch ionisierende Strahlung stärker gehemmt wird als in nicht mutierten Parallelzellen. Mehr noch, die DNS-Synthese erholte sich nach Bestrahlung viel langsamer als in der Vergleichsgruppe. Da aber beide Zellspezies keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Kettenverlängerung aufwiesen, wird der unterschiedliche Strahleneffekt einer verlängerten Replicon-Initiationshemmung in den Mutanten zugeschrieben, was beweist, daß eine defekte Doppelstrangbruchreparatur nicht zu einer Kettenverlängerungshemmung führen muß (68). Andererseits

scheint eine rasche Reparatur von Doppelstrangbrüchen das Wiederanlaufen der DNS-Synthese zu verkürzen (56). Demgegenüber wird vermutet, daß die Reparatur von DNS-Einzelstrangbrüchen, die eine Halbwertszeit von 5-10 min hat (ORMEROD 1976) keinen Einfluß auf die frühestens nach einer Stunde beginnende Erholung der DNS-Synthese hat (86). Allerdings ist es schwer, Erholungsvorgänge exakt zu messen, da sich innerhalb der ersten 2 Stunden Zellen nach Strahlenexposition mit anhaltender Initiationshemmung mit solchen beginnender Aufhebung dieser Hemmung vermischen (MEECHAN et al., 1984). Eine direkte Korrelation zwischen Hemmung der DNS-Synthese durch ionisierende Strahlung und strahleninduziertem "Mitosetod" von Zellen besteht offenbar nicht, was durch die unterschiedliche DNS-Synthesehemmung der beiden gleich strahlensensitiven A-T- und CHO-Zelltypen unterstrichen wird (86). GREEN et al. (1985) gelang es sogar, A-T-Zellen durch Beimpfung mit normaler Zell-DNS strahlenresistenter zu machen, ohne dabei a priori ihren strahlenresistenten DNS-Syntheseanteil zu beeinflussen.

2.5. Stimulierende Effekte durch ionisierende Strahlung, "Hormesis"

2.5.1. Einführung

Der Begriff "Hormesis" kommt aus dem Griechischen, wobei "Hormos" soviel wie "Anregung" bedeutet. Unter dem Begriff "Hormesis" versteht man demnach die Stimulation von Lebensfunktionen durch kleine Dosen eines prinzipiell schädlichen Agens. Dieses Agens kann physikalischen, chemischen, biologischen oder psychischen Ursprungs sein (73).

Der weitverbreiteten Kenntnis über negative Strahlenwirkungen steht die Hypothese gegenüber, daß kleinste Strahlendosen, etwa die natürliche Strahlenbelastung, die Vitalität von Organismen steigern(74). So zeigten Experimente von CONTER et al.(1983)(21) mit Algen nach Abschirmung von der Untergrundstrahlung u.a. eine Wachstumsverzögerung.

Zu ähnlichen Ergebnissen führten Abschirmungsversuche mit diversen Parameciumspezies (73, 74): Die bei Abschirmung (PLANEL et al. 1979) erniedrigte Reproduktionsrate ließ sich durch Gamma-Bestrahlung mit ²³²Th wieder erhöhen. Bleiabgeschirmte E.coli-Kulturen wuchsen langsamer und hatten nur 1/4 der Verfallsfrist der Kontrollkulturen. Versuche mit Artemia-Eiern, 1962, ergaben nach Abschirmung der natürlichen Strahlung nur noch 65% des Kontrollschlupfergebnisses (73). KUZIN et al.(1981) (65) stellte nach 10-tägiger Auswertung des individuellen Körpergewichts eine verlangsamte postnatale Ontogenese junger Ratten unter niedriger Untergrundstrahlung fest. LUCKEY (1985) (75) weist auf eine erhöhte Sterberate der Bevölkerung im "strahlenarmen" Südosten der USA hin (0,23 mSv/a).

In seinem Werk "Hormesis with Ionizing Radiation" (1980) kommt LUCKEY zu folgendem Schluß: "Many reviews conclude that radiation stimulation exists..", "...About 800 references (experiments with plants), with many showing statistically significant and excellent reproducibility..(and) about 200 references about animal data are summarized."(but)"Some note that variability is usually high."(73,74).

In seiner Monographie sammelte der Autor Daten über Strahlenhormesiseffekte, die von mehr als 55 Wissenschaftlern von

1898-1977 beschrieben worden waren.

Anhand dieser Ergebnisse postulierte LUCKEY eine nach links hypothetisch erweiterte Dosiswirkungskurve (Abb.:2.5.1.), die zeigt, daß "subambiante" Strahlung hemmend, geringfügig über der Norm liegende Strahldosen jedoch stimulierend auf zahlreiche biologische Parameter wie Wachstum, Entwicklung, Gesundheit, Lebensverlängerung, Fruchtbarkeit, Strahlenresistenz, Immunabwehr u.v.m. wirkt (73).

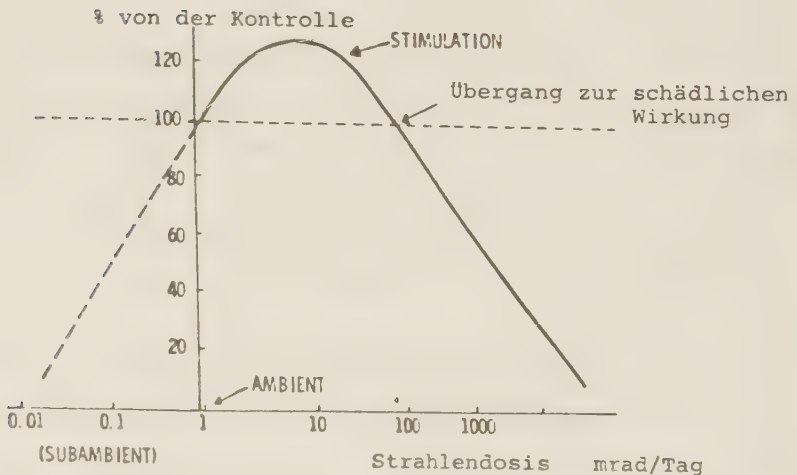


Abb.2.5.1.: Hypothese einer kompletten Dosis-Wirkungskurve für kontinuierlich zunehmende ionisierende Strahlung (LUCKEY,1980).

Auf einige Hormesiseffekte ionisierender Strahlen sei im Folgenden noch näher eingegangen, wobei eine Unterteilung in Gamma-(i.d.R. protrahierte Exposition) und Röntgenstrahlen-(im allgem. fraktionierte Bestrahlung) Effekte zweckmäßig erscheint.

2.5.2. Hormesiseffekte durch Gammastrahlen

LUCKEY (1980) berichtet über ^{60}Co -Bestrahlung von Viren, die ihre erhöhte Infektiosität zu Folge hatte. In sechs Experimenten wurden verschiedene Bakterienkulturen mit Dosen zwischen 1-200 kR γ -Strahlung zu erhöhter Stoffwechseltätigkeit und verstärktem Wachstum angeregt. Sporen sporenbildender Bakterien zeigten nach 20-1000 R einen dosisproportionalen Anstieg ihrer Zellteilungsrate, andere (nach 100kR) eine doppelt so intensive Zellvermehrung wie die Kontrolle. Chronische Bestrahlung von Pilzen (40-230 R/d) oder Einzelbestrahlung bis 15 kR erhöhte ihr Wachstum bzw. ihre Fähigkeit zur Keimreife (Germination), während 200 kR diese verringerten. Drei Hefearten zeigten jeweils nach 10- und 100 R Wachstums- und Respirationsmaxima. 200-500 R Kurzbestrahlung erhöhten Wachstum und Überlebensfähigkeit verschiedener Algen. Chlorella-DNS-Synthese begann z.B. schneller nach 3 kR-Bestrahlung in der G1-Phase.

Verschiedene Getreidesamen wurden in über 40 Versuchen chronisch (2,11 oder 13 R/d) oder akut (0.5- max. 20 kR) bestrahlt, was den Ernteertrag innerhalb von 2 Jahren auf 106 - 160 % gegenüber den Kontrollen ansteigen ließ. Dabei waren

*Neue Einheit Gray(Gy): $100 \text{ rad} = 1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg Gewebe} = 62,4 \times 10^{15} \text{ eV/g Gewebe}$, wobei 100 R ungefähr = 100 rad für Wasser (71, 104).

die Zunahmen der Samen mit dem geringsten Wassergehalt am höchsten. Ähnliche Ergebnisse wurden in 22 Versuchen mit diversen Gemüsesamen (Bohnen, Sojabohnen etc.) bei vergleichbaren Strahlendosen erzielt.

In 15 Experimenten zeigten Knollenpflanzen (wie Kartoffeln, Zwiebeln, Karotten, Lilien, Tulpen) nach einer Akutdosis zwischen 1-800 R oder 10 R/d(chronisch) verbesserte Keimung, schnellere Reifung und höheren Ertrag. Der Vitamin C-Gehalt der Kartoffeln war gegenüber den Kontrollen erhöht. Dosen über 3 kR wirkten hemmend. Bis zu 190% höheren Fruchtertrag erzielten mit 0,5-3 kR bestrahlte Gemüsesamen (Tomaten, Salat, Radischen, Pfeffer, Wein) in der nächsten Ernte (43 Versuche). Der Vitamin C-Gehalt war auch hier erhöht. Verschiedene Baumsamen zeigten in Bereichen zwischen 0,5 -3,5 kR (selten 10 kR) Wachstumssteigerung, während Baumpflanzen (Ahorn und Birke) unter diesen Bedingungen nach anfänglich erhöhten Photosyntheseraten ab dem zweiten Jahr in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Signifikante Erfolge wurden nach chronischer Bestrahlung der Baumsamen erzielt (1-5R/d bzw. 2- 20 R/d in 10 Monaten); 50-350 R/d ließen Tabakpflanzen schneller wachsen. Positive Effekte zeigten auch Orangen, Maulbeeren, Baumwoll-samen und diverse andere Pflanzen nach Akutbestrahlung mit 2,5-20 kR.

Einzeldosen zwischen 50-100 kR erhöhten die Teilungsfähigkeit von Protozoen, 600 kR waren tödlich. Verschiedene Insekten (Fliegen, Käfer) wiesen nach chronischen Dosen (2,5-100 R/d, 10-70 Tage lang) oder Akutbestrahlung mit 0,5-10(40)kR bis zu 180% höhere Lebensraten und-Resistenz sowie verkürzte Entwicklungszeiten über mehrere Generationen auf.

Chronische Bestrahlung (0,1 R/d über 8 h oder (0,3)1-5(19)R/d) führte bei Fischen, jungen Mäusen und Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen zu erhöhter Zellatmung, längerem Leben(117%), schnellerem Wachstum und geringerer Sterberate. In den untersuchten Zellen der Tiere waren verschiedene Enzymaktivitäten (ATP-ase, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase u.a.) erhöht. 0,3 R/Woche verringerten die Sterilität einer männlichen Dogge, während 3 R/Woche innerhalb eines Jahres sterilisierend wirkten. 5,4 R/Woche führten bei Mäusen zur erhöhten Vitalität, 0,43 R/d zu einem Anstieg der Wurfgröße(jedoch verbunden mit ansteigenden Sterilitätsraten). Knochenmarks-, HeLa-, und Tumorzellen zeigten nach in vitro-Bestrahlung (25-300 R) aufgrund vermehrter Zellteilung erhöhte Thymidinkinase-u. Polymerase Aktivitäten. Die G1-Phase war verkürzt. Eine 500 - 640 R-Einzeldosis erhöhte die Embryonalentwicklung und Schlupfrate von Hühnern. Die Jungen von Ratten, die am Ende der Trächtigkeit mit 10 mR/Std bestrahlt worden waren, zeigten gegenüber einer Akutbestrahlung mit 500 R eine 4 mal höhere Strahlenresistenz als die nur akutbestrahlten Kontrollen. Fraktionierte Bestrahlung mit 600 R am 2.,4.und 6. Tag nach Immunisierung mit Brucellen, stimulierte die Antikörperproduktion, v.a. die IgG-Formation.

2.5.3. Hormesiseffekte durch Röntgenstrahlen

Hinsichtlich der Dosisbereiche ergaben sich gegenüber der Gammastrahlung nur unwesentliche Unterschiede.

Die Anzahl der von LUCKEY tabellarisch zusammengefaßten Veröffentlichungen umfaßt für den Zeitraum von 1898-1976

insgesamt 351 Arbeiten, wovon sieben über Bakterien (Dosis: 4-8 kR), acht über Pilze (1- 25 kR), 15 über Hefen (Frakt. Dosen 10x74 R + 1x 200 R oder akut 0,2-1 kR), zwei über Algen, 62 über Getreide-und Gemüsesamen (Dosis: 0,1-1 kR), 17 über Knollen und Zwiebeln (Dosis: 0,4-1,5 kR), 63 über Samen von Garten- und Waldpflanzen (Dosis:0,1-3kR), 105 über diverse Pflanzenarten(0,4-6 kR oder 25 R/Woche), sieben über Wurzeln (Dosis:20-150 R), 48 über Wirbellose (chronische Dosen: 150 R/d, akut:(1)5-30(60)kR) sowie 97 Arbeiten über Wirbeltiere (fraktionierte Dosen: 0,1-2,2(5) R/d über 20 Tage - 3 Monate,akut: 5-300 R, chronische Dosen: 50-300 R/Woche, dabei sind vier in vitro-Bestrahlungen) berichten.

Dabei wurden je nach dem Versuchsobjekt u.a.folgende Hormesiseffekte beobachtet:

Erhöhung des Zellstoffwechsels, Wachstumssteigerung, "Schulter" in der Dosis-Wirkungskurve ,wie sie in Abb.2.5.1. dargestellt ist, schnellere Reifung, erhöhte Zellteilungsrate, vermehrte Sporenbildung , längere Lebensrate (115-200%), erhöhte CO₂-Bildung (118%),erhöhte Hitze- und Strahlenresistenz (160%),frühere Keimung, größerer Ernteertrag (114-160%), mehr Obst (115- 270%), mehr Vitamin C,verkürzte Ruhephase (von Knollen),schnellere Entwicklung und -Gewichtszunahme, höhere Schlupfraten,Lebensverlängerung (112-155%), verbesserte neurologische Funktion,erhöhte Resistenz und -Immunität gegen Krankheitserreger, bessere Wundheilung, erhöhte Strahlen- und Tumoresistenz ("Konditionierung") ,mehr Antikörper, bessere Fruchtbarkeit, eine Lympho-bzw. Leukozytose sowie eine erhöhte DNS-Syntheserate (CLOWES 1970,in 73). Aufgrund der Fülle von Ergebnissen sei an dieser Stelle nur

auf einige für diese Arbeit interessante Versuche näher eingegangen. So beschreibt LUCKEY eine bei Hefen an der LD⁵⁰ von 60 KR bemessene Erhöhung der Strahlenresistenz nach fraktionierter Vorbestrahlung mit 10 x 74 R (BETZ 1950 in 73). Bei einer Wiederholung dieser Arbeit mit Mäusen ergab sich gegenüber den Kontrollen eine Erhöhung der Überlebensrate nach Exposition mit 500 R bei den Tieren, die -gegenüber den Kontrollen-zuvor 10 mal mit 4R fraktioniert bestrahlt worden waren. Im Uterus bestrahlte Mäuse (70 R am 20.Tag) überlebten die LD_{90/30} im Alter von 4 Monaten signifikant besser als die Kontrollen. Erfolgte die Bestrahlung am 18. Tag der Trächtigkeit, ergab sich kein Effekt. Die Induktion von Strahlenresistenz scheint am Ende der Trächtigkeit am wirksamsten zu sein (73: CRONKITE, LORENZ et al. 1954, MEZENTSER 1963, VLASENKO 1964).

2.5.4. Weitere Hormesis-Arbeiten aus jüngster Zeit

HENDRY (48) stellte 1986 eine durch Vorbestrahlung induzierte Strahlenresistenz in Farnsporen fest. Danach war die Überlebensrate der mit ⁶⁰Co chronisch vorbestrahlten Sporen (0,96 Gy/min) 21 Tage nach erfolgter Akutbestrahlung gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht.

CONTER et al. zeigten 1986, daß kleinste chronische Dosen (31-bzw. 53 mGy/Jahr) die Proliferationsrate von Synechococcus lividus-Zellen erhöhen, die mit einem Anstieg bestimmter Enzymaktivitäten einhergeht (20).

So waren u.a. die Enzymaktivitäten erhöht, die in der Zelle Radikale und Peroxyde inaktivieren (Superoxid-Dismutase und

Glutathion-Reduktase). Der Anstieg der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität (nach 24 h) deutete auf eine Aktivierung des Glucosekatabolismus über den Pentosephosphatweg hin. Zudem zeigten die bestrahlten Zellen eine gegenüber den Kontrollen früher beginnende Photosynthese. Die Pigmentbildung war erhöht (22).

LUCKEY sah 1986 bei Versuchen mit Tetrahymena pyriformis seine Dosis-Wirkungs-Hypothese neuerlich bestätigt. Die Wachstumsrate der Organismen wurde durch "subambiante" Strahlung (0,15 mrad/d) gehemmt; in "ambienten" Bereichen (1,8 mrad /d) war sie normal und bei 7,3 bzw. 45 mrad/d signifikant erhöht (76).

SIMON et al. konnten 1977 durch eine Bestrahlungsdosis von 0,1- 0,2 C/kg die Schlupfergebnisse von Enteneiern in der zweiten Generation gegenüber den unbestrahlten Kontrollen verbessern (98).

OROSZLANY und HLUBIK konnten 1978 mit einer Dosis von 0,0516 C/kg die Sterberate von Wachtelembryonen verringern.

Der positive Effekt nahm in den nachfolgenden Generationen jedoch stark ab (in 81).

Versuche von CROUTE et al.(1986) zeigten, daß menschliche embryonale Lymphoblasten unter niedriger (40 mrad/d), chronischer Bestrahlung eine signifikant höhere Überlebensrate hatten, die mit einer höheren Verdopplungsrate/Tag verbunden war. Signifikant war der Effekt noch in der 21.-25. Generation (24).

Der Befund von OLIVIERI et al.(1984) (84), wonach mit ³H-Thymidin inkubierte menschliche Lymphozyten nach Akutbestrahlung mit 150 rad weniger Chromosomenaberrationen aufwiesen

als die nicht mit ^3H -dT inkubierten Kontrollen, konnte jüngst durch Untersuchungen von SANDERSON u. MORLEY (1986) bestätigt werden (93).

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Hormesisarbeiten ab 1980 gibt Tabelle 1:

Objekt	Bestrahlungsmodus/Dosen	Hormesiseffekt	Literatur
1. Farnsporen z.B. <i>Osmundia regalis</i>	kombiniert 0,96 Gy/h, 30 h lang + 1-40 Gy Akut Aufbereitung 1-5 h danach	Erhöhung der Strahlenresistenz	48, 14,
2. <i>Paramecium tetraurelia</i>	chronisch 0,02 Gy/Jahr	Wachstumsstimulation	23, 24,
3. <i>Tetrahymena pyriformis</i>	chronisch subambient: 0,0015 mGy/d ambient ca.: 0,01 mGy/d supraambient: 0,2 mGy/d	Zellvermehrung: -verringert -Kontrolle -erhöht	76
4. <i>Synechococcus lividus</i>	chronisch 0,53-74 mGy/J	initiale Wachstumsphase erhöht, Enzyminduktion	19, 20, 21, 22
5. menschl. Lymphocyten	kombiniert 24-32 h lang ^3H -dT (-0,1 uCi) + 1,5 Gy, 6 h später Aufarbeitung	Induktion eines Poly(ADP)-Ribose abhängigen Reparatursystems	121
6. menschl. Lymphocyten	kombiniert 6 h lang ^3H -dT (-1,0 uCi) + 1,5-3 Gy 7 Tage beob.	Senkung der Mutationsrate, Letalitätsrate unbeeinflusst	93
7. menschl. Lymphocyten	kombiniert 222Rn (4-8 mCi/1/2 J)* + UV (20 J/m ²)	UDS erhöht, Anstieg der Poly(ADP)-Ribosese Synthese	60, 109, 110, 111
8. T-Lymphocyten	chronisch 0,05 Gy über mehrere Tage	Anteil der Suppressor-T-Zellfraktion verringert--erhöhte Immunabwehr	3, 4, 74
9. menschl. Lymphocyten	chronisch 0,14 mGy/Monat	Verringerung der Mitomycin C induzierten Chromosomenaberrationen (SCE's)	110

Fortsetzung der Tabelle 1. Es wurden nur statistisch signifikante Ergebnisse aufgeführt. Die in vivo Bestrahlungen sind mit einem * gekennzeichnet.

10.menschl. Lymphocyten	kombiniert 0,01-0,1 μCi ^3H -dT 3 Tage lang + 3 Tage später 0,4-1,5 Gy 3-7 h später Aufarbeit.	Summe der Chromoso- menaberrationen aus frakt. + Akutbestrahlung als nach alleiniger Akutbestrahlung	84,80 <
11.Lungen- fibroblasten	* chronisch 0,4 mGy/Jahr	lebenslange Erhöhung des Zellverdopplungs- potentials; Enzyminduktion! (z.B.SOD)	24
12.murine Milz-Thymocyten	Akut 0,1-0,2 Gy	erhöhte Immunabwehr, siehe 8.	3
13.Mäuse	* chronisch 0,001-1,1 mGy/Tag	verlängerte Lebens- erwartung	108
14.3 monate alte männl. Mäuse	* fraktioniert 3 Monate lang 2,4 mGy/Tag	Abnahme der männl. Sterilitätsrate	69
15.Menschen Population aus:	* chronisch ca. 0,4 mGy/Tag	Verringerung der durch Krebs verursachten Sterbe- fälle. 123, 83, 51,52, Hendee W.R. in 74	124, 123, 83, 51,52, Hendee W.R. in 74

Aus diesen Ausführungen wird ersichtlich, daß sowohl die Dosisbereiche als auch die Dosishöhe, in denen "nützliche" Strahlenwirkungen beobachtet wurden, je nach Art des bestrahlten Objektes schwanken (73) (siehe hierzu Abb.:2.5.3.).

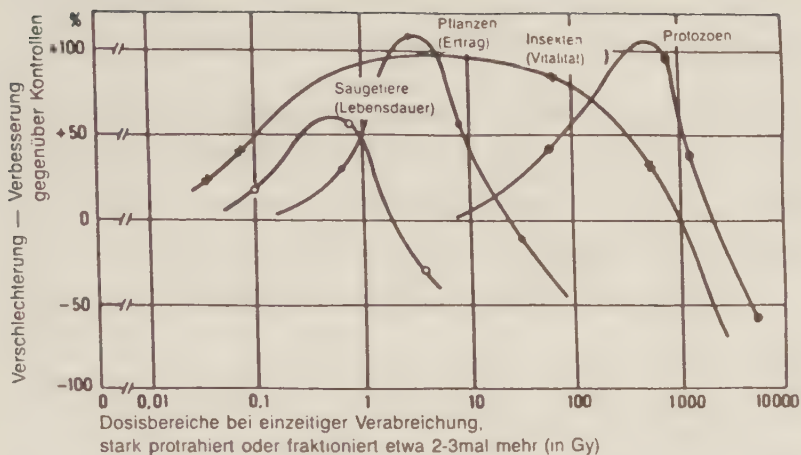


Abb.2.5.3.:

Dosisbereiche, in denen bei verschiedenen Objekten nützliche Strahlenwirkungen beobachtet wurden (Meßpunkte nach Angaben von Luckey, 1980). Man erkennt, daß die Protozoen besonders strahlenresistent sind. Bemerkenswert ist der große Dosisbereich der Insekten, für den positive Strahlenwirkungen ermittelt wurden.

(aus F. Wachsmann 1986, 118)

Demnach kann festgestellt werden:

Die meistgenannten Dosen, bei denen positive Effekte festgestellt wurden, liegen für Mäuse und Ratten bei 0,1-0,3-1,5 Gy Akutbestrahlung und/oder 0,2-5-200 mGy/d (73, 118, 119). Auch die in dieser Arbeit zur fraktionierten Bestrahlung durchgeführten Versuche lagen im o.g. Dosisbereich, deren Ausführung anschließend besprochen werden soll.

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Reagentien

Ammoniaklösung, mind. 25 %, MERCK Nr. 5432

1-β-D-Arabinofuranosyl-Cytosin (ara-C), SIGMA Nr. C-1768

Bisbenzimid, Calbiochem. GmbH Nr. H 33258

Desoxyribonukleinsäure (DNS), Na-Salz der DNS aus Kälberthymus⁶
Mol.Gewicht: $8,9 \times 10^6$, mind 95 % DNS, EGA-Chemie Nr.
16,820-3

2'-Desoxythymidin (dT), SERVA Nr. 18600

3,5-Diaminobenzoessäure (DABA), MERCK Nr. 820405

Diäthyläther, MERCK, Nr. 923

Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat, MERCK Nr. 6580

EDTA, Äthylendiamintetraessigsäure-Na²-Salz, SERVA Nr. 11280

D(+)-Glucose (Monohydrat), MERCK Nr. 8342

HANKS-Lösung (Ca⁺⁺ - und Mg⁺⁺ -frei)

1 l wässrige Lösung enthält:
Natriumchlorid 136,9 mmol
Dinatriumhydrogenphosphat 0,33 mmol
Kaliumchlorid 5,36 mmol
Kaliumdihydrogenphosphat 0,36 mmol
Glucose 5,55 mmol

Zu 1 l dieser Lösung werden 25 ml einer wässrigen
Natriumhydrogenkarbonat-Lösung (167 mmol/l) gegeben und
die gesamte Lösung mit Salzsäure (1 mol/l) auf pH = 7,4
eingestellt.

Hydroxyharnstoff (HU), SIGMA Nr. H-8627

Kaliumchlorid, MERCK Nr. 4936

Kaliumdihydrogenphosphat, MERCK Nr. 4871

Lyse-Lösung für die Nukleoidsedimentation

1 l wässrige Lösung enthält:
Natriumchlorid 1,5 mol
EDTA 0,1 mol
Triton X-100 0,7 % (v/v)
pH-Wert-Einstellung mit Natriumhydroxid (1 mol/l) auf pH
= 8,0.

Methanol, MERCK Nr. 6009

H-Methylthymidin, sterile wässrige Lösung

6,7 Ci/mmol (0,248 TBq/mmol), NEW ENGLAND NUCLEAR ,
NET-027

Nalidixinsäure, Natrium-Salz, SIGMA N-8878

Natriumchlorid, MERCK Nr. 6329E

Natronlauge, herstellt aus TITRISOL^R, 400 g NaOH für einen l

Natronlauge (1 mol/l), MERCK Nr. 9959

Novobiocin, Natrium-Salz, SIGMA N-1628

Perchlorsäure, 70 %, MERCK Nr. 519

Quickzint 402, Gel-Szintillator auf der Basis eines

Triton x-100/Toluolgemisches zur Messung wässriger Proben, ZINSSER Nr. 1993

Saccharose, zur Dichtegradientenzentrifugation

MERCK Nr. 7654

Salzsäure, hergestellt aus Titrisol^R,

36,46l Salzsäure pro 1 l (1 mol/l), MERCK Nr. 9973

Salzsäure, rauchend 37 %, MERCK Nr. 317

Stammlösung für den Saccharosegradienten zur Nukleoidsedimentation

1 l wässrige Lösung enthält:

Natriumchlorid 1,5 mol

Trispuffer 0,02 mol

EDTA 1 mmol

Bisbenzimid 1 mg/ml

Aus dieser Lösung wird eine 15- bzw. 30 %ige (g/g)

Saccharoselösung hergestellt,

pH-Wert-Einstellung mit rauchender Salzsäure auf pH = 8,0.

Tris(hydroxymethyl)aminomethan,

Puffersubstanz, MERCK Nr. 8382

Triton X-100

nichtionisches Detergens, Octylphenol-polyäthylenglykol-äther, SERVA Nr. 37240

Trypanblau, MERCK Nr. 11732.

3.2 Tiermaterial

Für sämtliche Versuche wurden etwa drei Monate alte, weibliche Wistar-Ratten aus institutseigener konventioneller Zucht mit einem Gewicht von 180 - 225 g verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen zu 5 Ratten in Makrolonkäfigen nach FISCHER und GÖNNERT (15 x 21 x 37 cm) bei Raumtemperaturen zwischen 22 - 24 °C. Standard-Diät-Alleinfutter (ALMA-FUTTER BÖTZENHARDT KG, Kempten) und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung.

3.3 Versuchsmethoden

Als Versuchsmaterial dienten kernhaltige Zellen aus dem Knochenmark beider Femuren einer Ratte.

3.3.1 Bestrahlung

3.3.1.1. In vivo-Bestrahlung

Die Exposition der Tiere erfolgte als Ganzkörperröntgenbestrahlung mit dem Kristalloflex 4 der Firma SIEMENS und HALSKE (Scheitelspannung 60 KV, Heizstrom 30 mA, Energiedosisleistung 0,8 Gy/min, Halbwertschicht 0,16 mm Cu, Filterung mit 0,16 mm Cu). Der Fokus-Tierabstand betrug je nach Versuchstyp entweder 20 oder 54 cm, was einer Dosisleistung von 0,8 Gy/min bzw. 0,1 Gy/min entsprach.

Hierzu wurden die Ratten einzeln oder zu zweit in ein oben offenes, rundes Glasgefäß mit einem Durchmesser von 20 cm verbracht und während der Bestrahlung mit einem verstell- und arretierbaren Drahtgitter in der Mitte des Glasgefäßes leicht fixiert. Die Kontrolltiere wurden unter den gleichen Bedin-

gungen einer gleichdauernden Scheinbestrahlung unterzogen. Diese in vivo-Bestrahlungen erfolgten entweder fraktioniert mit je einer Fraktion (ca. 9 Uhr morgens) an vier aufeinanderfolgenden Tagen in kleinen Dosen (0,0014-0,1 Gy) oder einmalig akut mit Dosen von 0,5 - 8 Gy oder in Kombination zueinander mit einer Wartezeit von 1 - 7 Tagen.

Um die Fehlerquote im Kleinstdosisbereich durch zeitliche Schwankungen möglichst gering zu halten, wurde die Dosisleistung bei der fraktionierten Bestrahlung durch Abschirmung der Ratten mit Hilfe von 4mm dicken Kunststoffplatten verringert, was die Bestrahlungszeit verlängerte. Bestrahlungsmodus:

Dosis --Plattenanzahl--Bestrahlungszeit--Dosis/min----:

0,0014 Gy	8	1 min	0,0014 Gy/min
0,006 Gy	6	2 min	0,003 Gy/min
0,012 Gy	4	80 s	0,009 Gy/min

Es sei noch erwähnt, daß die fraktionierte Bestrahlung bewußt auf 4 Tage, und die Wartezeit nach fraktionierter Bestrahlung auf 7 Tage begrenzt wurde, um subzelluläre Effekte (wie z.B. die Verschiebung der Zellreihe zu strahlenresistenteren Anteilen) auszuschließen (6, 27, 33, 37).

3.3.1.2. In vitro-Bestrahlung

Diese erfolgte analog der in vivo-Ganzkörperbestrahlung. Mit je 1 ml Zellsuspension gefüllte EPPENDORF-Röhrchen wurden in eine mit Eis gefüllte Petrischale mit einem Durchmesser von 9 cm verbracht und (unter Zuhilfenahme eines Stativs) mit einem Focus-Zellabstand von 14 cm (1,6 Gy/min) bestrahlt. Die maximale Dosis der Akutbestrahlung lag bei 64 Gy (=6400 R). Während dieser Zeit wurden die Kontrollen im

Dunkeln auf Eis gehalten.

3.3.2. Herstellen der Knochenmarkszellsuspension

In oberflächlicher Äthernarkose (Stadium der Anästhesie) wurden die Tiere dekapitiert und entblutet.

Nach Präparation der beiden Femuren und Absetzen der distalen und proximalen Epiphysen mit der Schere wurden die Diaphysen jeweils mit 5 ml Hankslösung ausgewaschen (empfohlene Kanüle: BRAUN-Melsungen, Stericab^R L, 0,9 x 38 mm) und die resultierende Suspension 90 s bei 650 x g zentrifugiert (HEKA-Tisch-zentrifuge Nr. 25445).

Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment unter ständiger Eiskühlung mit 2,5 ml Hankslösung resuspendiert, durch zweilagiges Strumpfnylon filtriert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gehalten.

Die Zellkonzentration wurde durch Auszählen in einer Zählkammer nach FUCHS-ROSENTHAL ermittelt und die erforderliche Zelldichte durch Verdünnen der Ausgangssuspension mit HU-freier (SDS)-bzw. HU-haltiger (UDS)Hanks-Lösung hergestellt. Ausgewertet wurden nur Zellen, die keine Anzeichen des Zelluntergangs (wie hydrop. Degeneration) erkennen ließen. Zur Überprüfung der korrekten Auszählung wurden in den ersten beiden Versuchen 100 ul der eingestellten Zellsuspension mit 10 ul einer 2 %igen Trypanblaulösung eingefärbt und der prozentuale Anteil der gefärbten ,d.h.geschädigten Zellen (die nichtintakte Zellmembran ist für Trypanblau permeabel) von mindestens 500 ausgewerteten Zellen lichtmikroskopisch in der FUCHS-ROSENTHAL-Zählkammer ermittelt.

3.3.3. Bestimmung der Desoxyribonukleinsäure-Synthese

Die semikonservative- und unprogrammierte Desoxyribonukleinsäuresynthese (SDS bzw. UDS) wurden in vitro über den Einbau der radioaktiv markierten DNS-Vorstufe ³H-Thymin in die säurefällbare, hydrolysierbare Zellfraktion bestimmt.

3.3.3.1. Semikonservative DNS-Synthese (SDS)

Die auf eine Zellkonzentration von $8,0 \times 10^6$ /ml eingestellte Zellsuspension (Volumen ca. 10 ml) wurde entsprechend der vorgesehenen Anzahl Einzelansätze zu je 1ml in Reaktionsgefäße (EPPENDORF 3812) pipettiert und anschließend 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln im Wasserbad (KOTTERMANN GFL, Typ. 1083) vorinkubiert. Soweit die Wirkung bestimmter pharmakologischer Substanzen (Hydroxyharnstoff, Novobiocin, Nalidixinsäure, ara-C) untersucht werden sollte, wurden die Agentien den Einzelansätzen in der gewünschten Konzentration, in 100 µl Hanks-Medium gelöst, zugesetzt. Die Kontrollansätze erhielten einen Zusatz von 100 µl substanzfreier Hankslösung. Nach Abschluß der Vorinkubation wurden die Ansätze 8 s bei $9.980 \times g$ (EPPENDORF-Zentrifuge 5412) zentrifugiert und das erhaltene Zellsediment in 1,75 ml (für 3 Ansätze zu je 0,5 ml Hankslösung) vorsichtig resuspendiert.

In einigen Bestrahlungsversuchen wurden zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der ³H-Einbaurates die Vorinkubationszeiten von 0 - 90 min variiert; bei Versuchen zur Hyperthermie wurde die Temperatur während der Vorinkubation auf $43 \pm 0,5$ °C erhöht.

Nach Aufteilung der im Anschluß an die Vorinkubation

erhaltenen Zellsuspension auf jeweils 3 Einzelansätze zu 0,5 ml und Zusatz von 50 μ l 3 H-dT (1,25 uCi bzw, 46,25 KBq) je Probe erfolgte die Hauptinkubation 90 min bei 37 $^{\circ}$ C .In dieser Zeit wurde somit 3 H-dT in die DNS eingebaut. Intrazelluläre Aufnahme und Einbau von 3 H-dT wurden durch Fällung mit 1 ml kalter Perchlorsäure (PCA) (1,5 mol/l) beendet. Anschließend wurden die Ansätze 10 min lang bei -15 $^{\circ}$ C auf Eis gehalten. Zur Ermittlung der säurefällbaren 3 H-Aktivität zu Inkubationsbeginn ("Untergrundaktivität") wurden Kontrollproben unmittelbar nach Zusatz von 3 H-dT gefällt und bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelegt. Nach der Kühlung wurden alle Ansätze 5 min bei 6.500 x g zentrifugiert (HERAEUS-CHRIST-Zentrifuge Typ. 1240) und der Überstand anschließend abgesaugt. Das Sediment wurde zweimal mit 2 ml einer 1-molaren PCA gewaschen.

Zur Lösung(Solubilisierung) des DNS-haltigen Sediments wurden den Proben 2 ml einer 1-molaren PCA-Lösung zugesetzt. Durch 20 -minütiges Erhitzen auf 90 $^{\circ}$ C im Wasserbad erfolgte die hydrolytische Spaltung der DNS in säurelösliche Bruchstücke und einzelne Nukleotide. Nach anschließender Kühlung für 20 min bei -15 $^{\circ}$ C im Eisfach und erneuter Zentrifugation (10 min bei 6.500 x g ,HERAEUS-CHRIST Typ 1240) wurde das Hydrolysat als Überstand zur Messung der Radioaktivität und des Nukleinsäuregehaltes gewonnen.

Zur Ermittlung der 3 H-dT-Aktivität wurden 0,5 ml des Hydrolysa^Rtes mit 3 ml Flüssigszintillator Quickszint 402 in Polypropylen-Zählhülsen (ZINSSER Minivials 3000882)vermischt. Die Impulsrate wurde in einem Flüssigszintillationszähler

(KONTRON MR 300, Meßdauer 5 min) gemessen. Der Quencheffekt wurde über einen externen Standard korrigiert. Die Zerfälle/min wurden auf den jeweiligen DNS-Gehalt der Probe bezogen und für 1 mg DNS berechnet.

3.3.3.2. Unprogrammierte DNS-Synthese (UDS)

Zur Untersuchung der unprogrammierten (reparaturbedingten) DNS-Synthese (UDS) ist es notwendig, die an der Gesamt-DNS-Syntheseleistung in wesentlich größerem Umfang beteiligte replikative Synthese quantitativ zu hemmen. Dies kann durch Hydroxyharnstoff über eine Blockade des Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase-Systems erreicht werden, ohne die Reparaturkapazität der Zelle wesentlich zu beeinträchtigen (112).

Die UDS wurde in einigen Röntgenbestrahlungsversuchen zusätzlich durch UV-Bestrahlung, die in erster Linie eine Langkettenreparatur (67) bewirkt, stimuliert.

Bei Versuchen zur UDS wurden die Zellansätze mit einem Zusatz von 10^{-2} mol HU/l 30 min vorinkubiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie unter 3.3.3.1. beschrieben, jedoch wurden zur Hauptinkubation $100 \mu\text{l}$ H-dT mit einer Aktivität von 5 uCi (185 KBq) zugesetzt.

Evtl. zusätzliche UV-Bestrahlung wurde im Anschluß an die Vorinkubation vorgenommen. Hierzu wurden die Zellsuspensionen in sehr dünner Schicht (0.045 ml/cm^2) auf eisgekühlte Petrischalen aufgetragen und mit einer UV-Lampe (PHILIPS TUV 30 W) bestrahlt. Bei jedem UDS-Ansatz wurde eine unbestrahlte Kontrolle den gleichen Versuchsbedingungen unterzogen. Nach

Beendigung der Bestrahlung wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, wobei die Petrischalen mit 1 ml HU-Hankslösung nachgespült wurden. Sodann wurden die Ansätze 8 s abgeschleudert, das Zellsediment in 1,75 ml Hankslösung resuspendiert und anschließend wie unter 3.3.3.1. beschrieben weiter verarbeitet.

3.3.4. Isotopenverdünnungsanalyse

Anhand einer Isotopenverdünnungsanalyse sollten Rückschlüsse auf das Verhalten des endogenen Thymidinpools gezogen werden (9, 92).

Unterschiedlich große Thymidinpools von Zellen verdünnen gleiche gleiche Tracerzusätze unterschiedlich stark, was sich in einer unterschiedlichen $^3\text{H-dT}$ -Einbaurate äußert, obwohl die Gesamt-DNS-Syntheseleistung gleichbleibt. Werden die als Prozentabweichung von Vergleichswerten angegebenen Effekte von Testsubstanzen auf den Einbau von $^3\text{H-dT}$ in die DNS durch Zugabe unmarkierten Thymidins zum Inkubationsmedium beeinflusst, kann angenommen werden, daß an der in Frage kommenden Wirkung Veränderungen im DNS-Vorstufenpool beteiligt sind (9,92,117). Liegt ein solcher Einfluß nicht vor, wird im allgemeinen davon ausgegangen, daß Änderungen des endogenen dT-Pools nicht zur Erklärung des veränderten Tracereinbaus herangezogen werden können.

Nach Zusatz steigender Molaritäten unmarkierten Thymidins in 100 μl Hanks-Lösung wurden die behandelten (bestrahlten und scheinbestrahlten) Knochenmarkszellen 30 min vorinkubiert.

Der behandelten Kontrollfraktion wurden 100 μ l dT-freier Hanks Lösung zur Vorinkubation zugesetzt (keine Beeinflussung der ³H-dT-Inkorporation). Zentrifugation und Mediumwechsel führten im weiteren Verlauf zu den unter 3.3.3.1. ff. beschriebenen Schritten.

3.3.5. Nukleoidsedimentation

3.3.5.1. Prinzip

Die Sedimentation von Nukleoiden gilt als sensibles Nachweisverfahren zur Erkennung bestimmter struktureller DNS-Veränderungen (Weniger, in 106).

Das Prinzip der Methode beruht auf der spezifischen Sedimentationsfähigkeit unterschiedlich dichter(-kompakter) "Teilchen" in einem Dichtegradienten. Diese Teilchen werden als Nukleoide bezeichnet, worunter man Zellkernpartikel versteht, die v.a. aus Zellkern-DNS in weitgehend nativer, superhelikaler Form, Ribonukleinsäure sowie Spuren von Protein bestehen (106). Nukleoide entstehen durch vorsichtige Lyse von Zellen in Gegenwart von nicht-ionischen Detergentien bei hoher Salzkonzentration *in vitro* und bilden zusammen ein gelartiges Aggregat, dessen Form und Position nach anschließender Zentrifugation in einem neutralen Bisbenzimid-haltigen Saccharosegradienten als fluoreszierender Nukleoid-Bisbenzimid-komplex im UV-Licht unmittelbar sichtbar gemacht und ausgemessen werden kann. Da intakte superhelikale DNS eine kompaktere Struktur aufweist als eine mit Strangbrüchen versehene,

sedimentieren ungeschädigte Nukleotide besser als solche mit strukturell modifizierter DNS (106). Einzelstrangbrüche z.B. führen zu einer höheren freien Drehbarkeit der DNS und zum Verlust von superhelikalen Windungen, woraus eine Strukturlockerung und damit eine verringerte Sedimentierbarkeit resultieren. Der Vergleich beider Sedimentationsstrecken von Nukleotiden aus entsprechend behandelten Zellen und von Kontrollzellen erlaubt somit einerseits Rückschlüsse auf den Schädigungsgrad der Zellen, andererseits- aus der während der Erholungsphase der geschädigten Zellen zeitabhängigen Normalisierung der Nukleotidsedimentation- Aussagen über den Ablauf von Reparaturvorgängen (106).

3.3.5.2. Ausführung

Gewinnung und Sedimentation der Nukleotide richteten sich im wesentlichen nach dem von WENIGER (106) empfohlenen Vorgehen. Mit einem Gradientenmischer (TEGIMENTA AG Rotkreuz, Schweiz) wurden in 6 Zellulosenitratröhrchen (Centrifuge tubes 33137) lineare Saccharosegradienten (15 - 30 %ige Saccharoselösung, Füllung der Röhrchen bis 9 mm unter den oberen Rand) hergestellt und zur Festigung etwa 15 h bei 4 °C in einer Kühlzelle aufbewahrt. Im Anschluß an diese Wartezeit wurden jedem Gradienten zunächst 0,34 ml Lyseelösung (Herstellung siehe unter 3.1.) und dieser anschließend 0,25 ml Zellsuspension überschichtet.

Die Herstellung der Zellsuspension erfolgte wie in 3.3.3.1. beschrieben. Die Zellkonzentration wurde auf 15×10^6 Zellen/ml einer Ca⁺⁺- und Mg⁺⁺-freien Hankslösung eingestellt.

Die Zellen wurden 30 min lang im Dunkeln bei Zimmer-

temperatur lysiert. Anschließend wurden die Ansätze zunächst 30 min lang bei 20 °C und 10.000 U/min, danach bei gleicher Temperatur mit 25.000 U/min(=76.400 x g) 120 min lang zentrifugiert (BECKMANN-Ultrazentrifuge L2, Rotor SW 41). Die Position des DNS-Bisbenzimid-Komplexes wurde unter einer UV-Lampe (Emission bei 366 nm) sichtbar gemacht (blau-fluoreszierende Banden); die Sedimentationsstrecke, definiert als die Entfernung der Bandenmitte vom oberen Flüssigkeitsmeniskus in den Zentrifugenhülsen, wurde gemessen und prozentual auf die durchschnittliche Sedimentationsstrecke der Kontrollproben bezogen.

3.3.6. DNS-Konzentration

1 ml des nach 3.3.3.1. gewonnenen Überstandes wurde bei 260 nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren) im Spektralphotometer (PMQ II, ZEISS, Stuttgart) auf seine Extinktion hin gemessen. Als Reagentienleerwert diente eine DNS-freie Perchlorsäurelösung (1 mol/l). Die DNS-Konzentration oder Zellzahl wurde anhand einer Eichkurve in einem Konzentrationsbereich von 0,0625 - 1 mg DNS/ml bestimmt.

3.4. Statistische Auswertung

Für jeweils eine Versuchsreihe wurden die Mittelwerte aus den Parallelansätzen und ihre Standardabweichung berechnet. Entsprechend wurde bei Wiederholungsanalysen mit den Werten der Einzelversuche verfahren.

Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem t-Test nach

STUDENT (für $p < 0,05$).

Ließen die Kurven einen nahezu linearen Verlauf erkennen, wurden die lineare Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient r berechnet (Statistik-Programm pCm Typ 3032 , COMMODORE-Computer.

Anmerkung: Der Anschaulichkeit halber wurde die Abszisse in den Abbildungen 4.1.4. , 4.3.1.2. , 4.3.2.1. und 4.3.2.2. nicht-maßstabgerecht verkürzt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Versuche zur Methodik

Bereits frühere Untersuchungen hatten ergeben, daß sowohl Milz- und Thymuszellen als auch Knochenmarkszellen in Hanks-Medium noch nach Stunden einen für Kurzzeitanalysen der DNS-Synthese in vitro voll ausreichenden Vitalitätsgrad aufweisen. Nach 120 min beispielsweise war die Zellkonzentration nur um 20 % verringert (99). Wurde der H -dT-Einbau in die DNS gemessen, ergab eine 60 minütige Inkubationszeit bis zu einer Zellkonzentration von 8×10^6 /ml einen zellproportionalen Anstieg der H -Einbaurrate (99). Die hier mitgeteilten Versuche haben somit nur ergänzenden Charakter.

4.1.1. Photometrische Messung der DNS-Konzentration

Zur Erstellung der Eichkurve wurde eine reine DNS-Lösung mit den in Abb. 4.1.1. angegebenen Konzentrationen hergestellt und den gleichen Versuchsbedingungen wie die Markierungsanalysen unterworfen. Die spektrophotometrische Messung erfolgte bei 260 nm mit DNS-freier Perchlorsäure (1 mol/l) als Referenzlösung.

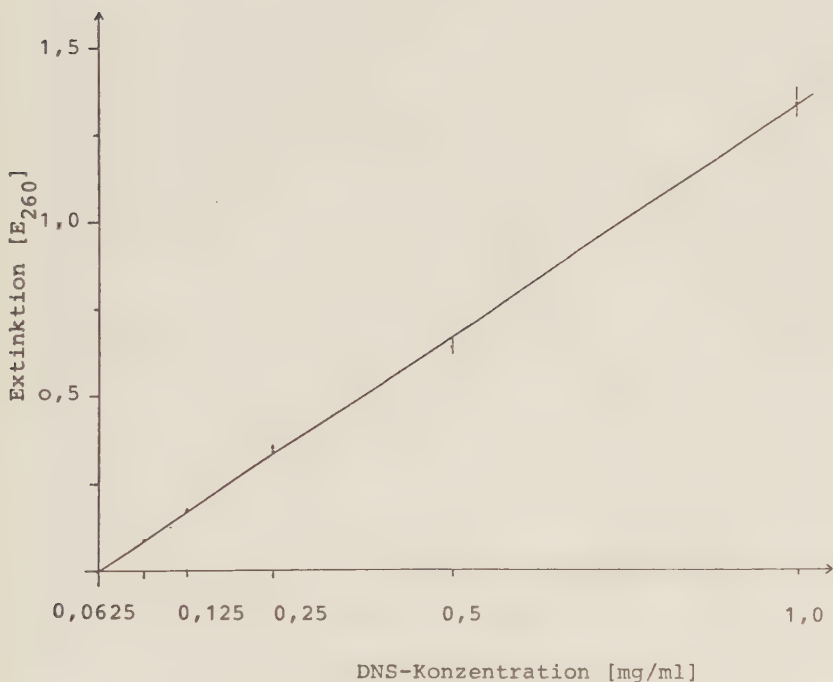


Abb.4.1.1.:

DNS-Eichkurve - photometrische Messung.
Extinktion E₂₆₀ in Abhängigkeit von der DNS-Konzentration
n=3. Lineare Regressionsgerade:

$$y = 0,0001 + 1,339x ; r = 0,9996$$

4.1.2. Semikonservative DNS-Synthese (SDS); ^3H -dT Einbau
in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Mit zunehmender Inkubationszeit zeigte sich bei einer Zellkonzentration von 8×10^6 /ml- ein zunächst steiler, später jedoch (nach etwa 60 min) kontinuierlich flacher werdender Anstieg der Einbaurrate (Abb. 4.1.2.)

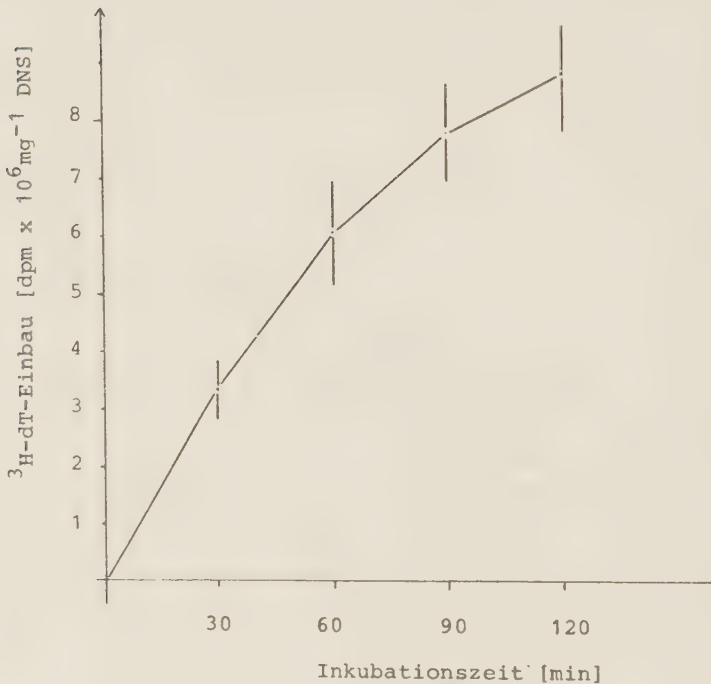


Abb.4.1.2.:

^3H -Semikonservativer H-dT-Einbau in die DNS in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

8×10^6 Zellen/ml
 4 Tiere , n=12

4.1.3. SDS; ^3H -dT Einbau in Abhängigkeit von der ^3H -dT Konzentration

In dem gewählten ^3H -dT-Konzentrationsbereich von 0,3125-5,0 $\mu\text{Ci}/\text{Ansatz}$ erhöhte sich der Tritiumeinbau in die säurefällbare Fraktion direkt proportional zur Konzentration der DNS-Vorstufe (Abb.4.1.3.). Die Nullpunktabweichung lag innerhalb der Standardabweichung.

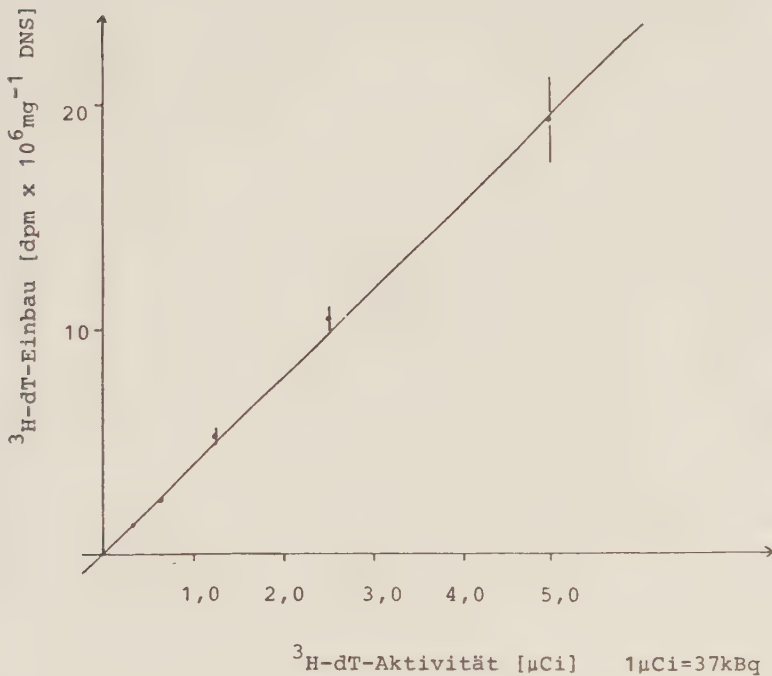


Abb.4.1.3.:

Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in Abhängigkeit von der Tritiumthymidinvorlage.

6
8 x 10⁶ Zellen/ml
30 min Vorinkubation, 90 min Hauptinkubation
n=3. Lineare Regressionsgerade:
 $y = 144.141,923 \text{ dpm} + 3.924936,4x$; $r = 0,99899$.

4.1.4. SDS; Isotopenverdünnungsanalyse

Hinweise auf mögliche Veränderungen des endogenen Thymidin-³ pools und seinen Einfluß auf den H-dT-Einbau in die DNS sollten durch Zugabe unmarkierten Thymidins in Konzentrationen von 2-512 µg/ml (8,2-21155,6 µmol/l) während der Vorinkubation gewonnen werden (Abb.4.1.4.). Erwartungsgemäß wurde der

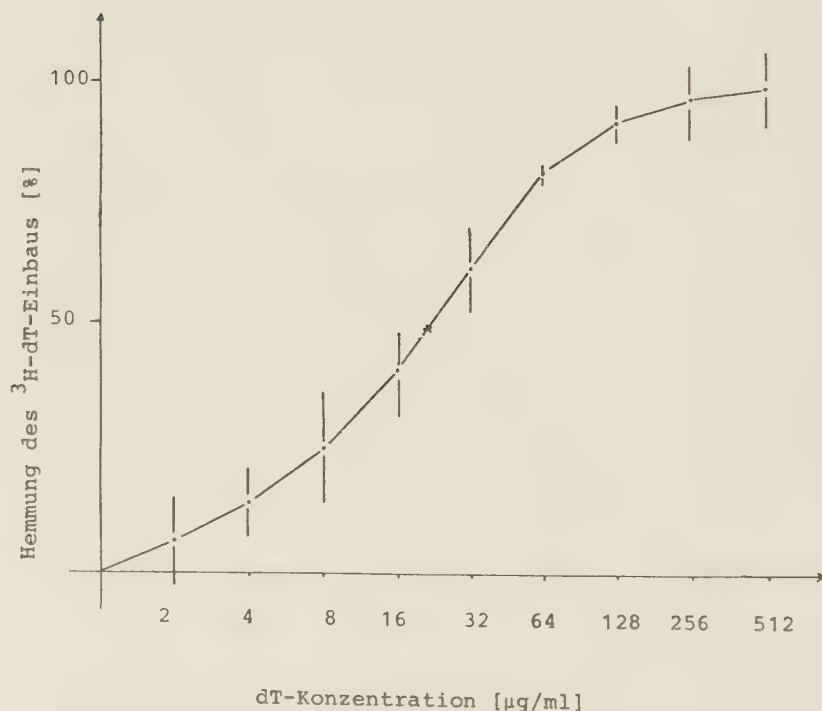


Abb.4.1.4.:

Einfluß "kalten" Thymidins auf den semikonservativen H-dT-³Einbau in die DNS. Einbau in Prozent, bezogen auf die nicht mit dT behandelte Kontrolle.

8 x 10⁶ Zellen/ml, H-Aktivität: 1,25 µCi/Ansatz
 90 min Hauptinkubationszeit. 2 Tiere, 9 Ansätze zu je n=6.
 Die DE lag bei 24 µg dT/ml Zellsuspension.

3
H-Einbau durch steigende Konzentrationen unmarkierten (kalten) Thymidins zurückgedrängt. 50 %ige Hemmung konnte durch Zusatz von 24 $\mu\text{g/ml}$ $\approx 98,4 \mu\text{mol/l}$ erreicht werden. Da diese in Thymuszellen bereits durch Zusatz von 3 $\mu\text{g dT/ml}$ erzielt wurde (99), läßt sich für Knochenmarkszellen auf einen 8 mal größeren Thymidinpool schließen.

4.1.5. Unprogrammierte (reparaturbedingte) DNS-Synthese (UDS);
UV-bedingte Stimulation nach vorheriger in vivo-Rönt-
genbestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy

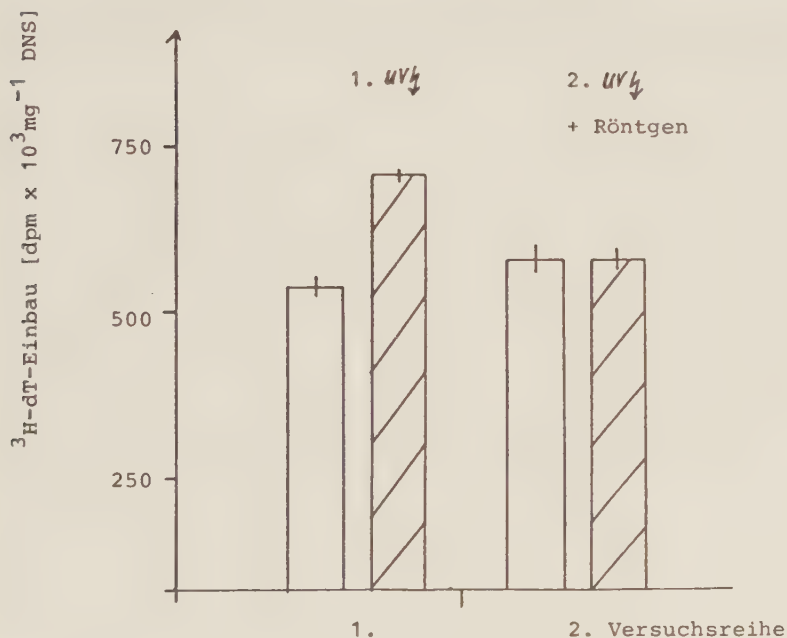


Abb.4.1.5.:

- 3
1. Unprogrammierter H-dT-Einbau in die DNS₂ nach in vitro-UV-Bestrahlung mit 32 Jxm^{-2} .
2. Aufhebung der UV-bedingten Stimulation nach vorheriger in vivo-Röntgenstrahlenexposition.
- 6
3
8 x 10⁶ Zellen/ml . H-Aktivität: 5,0 $\mu\text{Ci/Ansatz}$
2 Tiere, 2 Versuchsreihen, 4 Ansätze zu je n=3.

In den Versuchen von Spath (99) induzierten UV-Dosen von 16×10^{-2} Jxm eine maximale Zunahme des unprogrammierten $^3\text{H-dT}$ -Einbaus von 25-30 %. Auch unter den vorliegenden Bedingungen ließ sich die unprogrammierte Reparatursynthese durch 32×10^{-2} Jxm UV-Licht um rund 38 % steigern (Abb.4.1.5.).

Die UV-induzierte UDS-Stimulation konnte durch vorangegangene in vivo-Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy aufgehoben werden.

4.2. Festlegen der Versuchsbedingungen

4.2.1. Semikonservative und unprogrammierte DNS-Synthese (SDS und UDS)

Die Zellsuspension wurde auf 8×10^6 /ml Suspension eingestellt. Je Femur standen ca. 40×10^6 Zellen zur Verfügung. Da beide Femuren einer Ratte verarbeitet wurden, konnte pro Tier eine Zellsuspensionsmenge von etwa 10 ml gewonnen werden. Die Vorinkubation der Knochenmarkszellen wurde auf 30 min, die Hauptinkubation auf 90 min festgelegt. Um eine auswertbar hohe Impulsrate zu erreichen, wurde zur Ermittlung der $^3\text{H-dT}$ mit einer Aktivität von 1,25 μCi (46,25 kBq) und zur Ermittlung der UDS den Zellen $^3\text{H-dT}$ mit einer Aktivität von 5,0 μCi (185 kBq)/Probe zugesetzt.

4.2.2. Isotopenverdünnungsanalyse

Um Hinweise zu erhalten, in wie weit strahlenbedingte Effekte in Knochenmarkszellen wirklich auf eine Veränderung der DNS-Synthese und nicht auf Schwankungen der Thymidin-Poolgrößen

zurückzuführen sind (Abb.4.1.4.), wurde einem Teil der Ansätze 24 µg kaltes Thymidin (dT)/ml zugesetzt. Mit dieser dT-Konzentration konnte nach Auffüllung des Thymidin-pools eine 50 %ige Hemmung des ³H-dT-Einbaus erzielt werden.

4.2.3. Bestrahlungsmodus

4.2.3.1. In vivo-Bestrahlung

Die Festlegung des Bestrahlungsmodus erfolgte nach den für Milz- und Thymuszellen erarbeiteten Bedingungen (Tempel, unveröffentlicht). Für diese Zellen wurden die deutlichsten Effekte fraktionierter Vorbestrahlung an 4 aufeinanderfolgenden Tagen in Kombination mit einer Akutbestrahlung am 3. oder 5. Tag nach der letzten Fraktion ermittelt, wobei sich eine einstündige Wartezeit zwischen der Akutbestrahlung und der Aufarbeitung der Zellen zum Nachweis des Effekts als zweckmäßig erwiesen hatte (Abb.4.5.3.1., S.70).

Die Wahl der Bestrahlungsdosen erfolgte in Abstimmung mit den in Tabelle 2 zusammengefaßten Ergebnissen der Vorversuche, wonach die deutlichsten stimulierenden Effekte mit 4 x 0,012 Gy + 4 Gy Akutbestrahlung erzielt worden waren.

4.2.3.2. In vitro-Bestrahlung

Zur akuten in vitro-Bestrahlung wurden Dosen bis zu 64 Gy gewählt. Die Zellen wurden danach entweder 1 h lang in frischer Hankslösung (1,75 ml/Probe) inkubiert (um einen besseren Vergleich zu den in vivo-Bestrahlungsversuchen zu gewährleisten) oder sofort anschließend mit ³H-dT 90 min lang markiert.

4.2.4. Nukleoidsedimentation

Die Knochenmarkszellkonzentration wurde -laborüblich- auf 15×10^6 Zellen/ml eingestellt (99,106). Nach einer Lysezeit von 30 min wurden die Ansätze zunächst 30 min lang bei 10.000 U/min und anschließend 120 min bei 25.000 U/min bei 20 °C zentrifugiert. Durch die Vorzentrifugation konnten fehlerhafte Analysen (wie Klumpen- und Fadenbildung der Sedimentationsbanden) weitgehend verhindert werden.

Zur Erfassung von strahlenbedingten Reparatureffekten wurden die Zellen vor der Lyse mit Dosen bis 6,4 Gy (Dosisleistung von 1,6 Gy/min) bestrahlt. Danach wurde die Reparaturfähigkeit der Zellen durch unterschiedlich lange (3-32 min) Nachinkubation der Zellen in Hanksmedium ermittelt.

4.3. In vitro Versuche zur Charakterisierung der Zellen

4.3.1. In vitro Versuche zur semikonservativen DNS-Synthese (SDS)

4.3.1.1. Hydroxyharnstoff (HU)

HU hemmt über eine Entleerung des Desoxyribonukleotidtriphosphat(dNTP)-Pools -dies bedeutet einen Mangel an DNS-Vorstufen- die semikonservative DNS-Synthese (112), indem er das Ribonukleotidreduktase-System, das für die Bereitstellung von dNTP's verantwortlich ist, blockiert (30,99).

Wie Abb.4.3.1.1. zeigt, konnte der semikonservative $^3\text{H-dT}$ -Einbau durch steigende Konzentrationen von Hydroxyharnstoff dosisabhängig gehemmt werden. Die DNS-Synthesehemmung war bis zu einer Konzentration von 10^{-4} mol HU/ml gering, nahm dann jedoch rasch zu (DE : ca. $7,8 \times 10^{-3}$ mol/l).

Die geringgradige Stimulation des ^3H -dT-Einbaus bei einer
 10^{-5} HU-Konzentration von 10^{-5} mol/l bestätigt die etwa von MANSO-
 MARTINEZ et al. (1978) geäußerte Vermutung, daß niedrige HU-
 10^{-5} 10^{-4} Dosen (10^{-5} und 10^{-4} mol/l) stimulierend auf die Initiation
 der DNS-Synthese wirken (99).

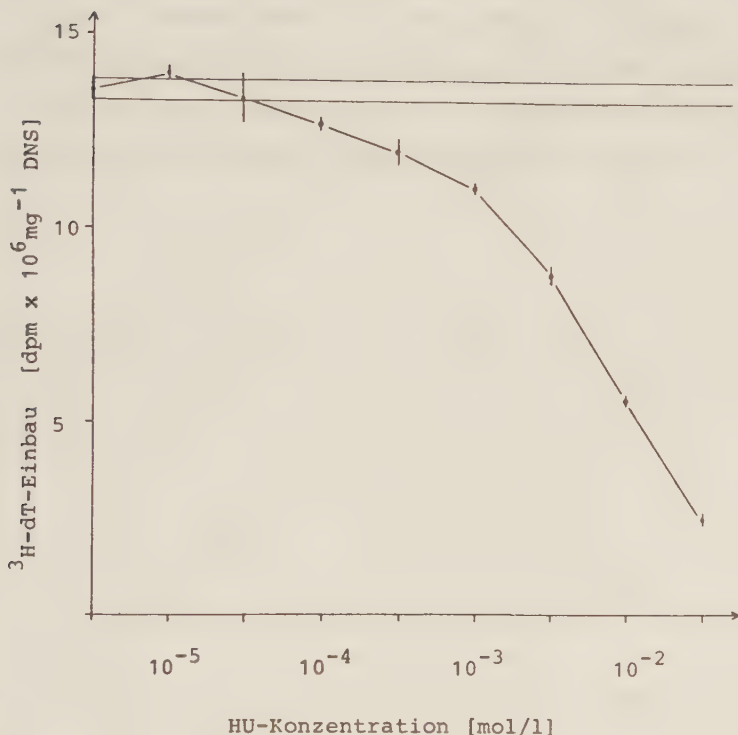


Abb. 4.3.1.1.:

Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in die DNS in Abhängigkeit
 von der Hydroxyharnstoff (HU)-Konzentration

(5×10^{-2} mol/l) ^3H -Aktivität: 92,5 kBq (2,5 μCi)/Ansatz
 1 Tier, 9 Ansätze zu je $n=3$.

4.3.1.2. Novobiocin

Der DNS-Synthesehemmstoff Novobiocin beeinflusst durch Hemmung der Topoisomerase II die superhelikale Struktur der DNS (107). Aus Abb.4.3.1.2. ist ersichtlich, daß die DNS-Synthese der Knochenmarkszellen durch Novobiocin dosisabhängig gehemmt wird. Eine 50 %ige Hemmung gegenüber der Kontrolle wurde für eine Konzentration von ca. 900 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt (51,13 % $\pm$ 1,2 %). Dieser Wert liegt zwischen den unter vergleichbaren Bedingungen für Thymus- und Milzzellen ermittelten Werten (107). Durch 3600 μg Novobiocin/ml Zellsuspension wurde der

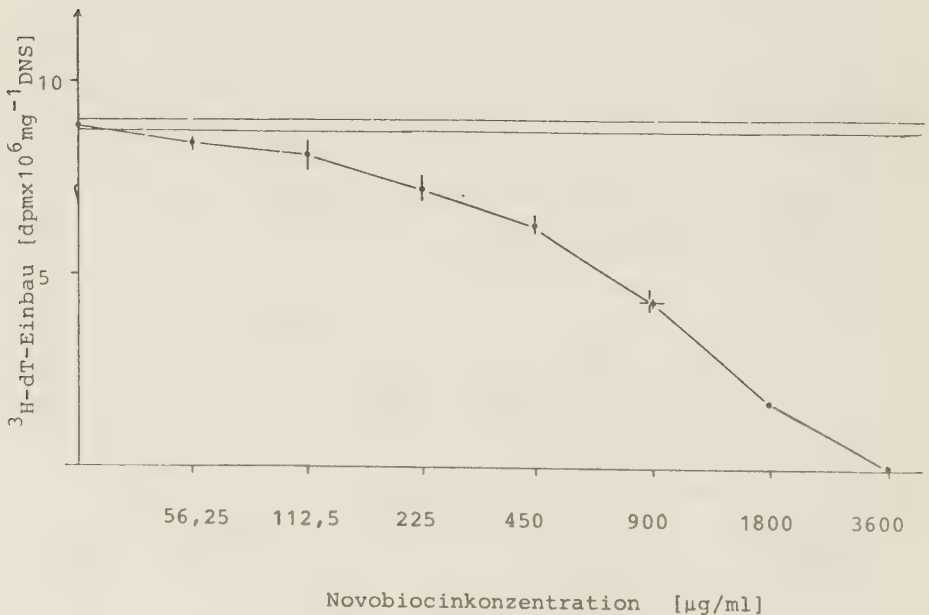


Abb.4.3.1.2.:

³
Semikonservativer H-dT-Einbau in Abhängigkeit
von der Novobiocin-Konzentration ($\leq$ 3600 $\mu\text{g/ml}$).
1 Tier, 8 Ansätze zu je $n=3$.

3
H-dT-Einbau in die DNS nahezu vollständig unterbunden.

4.3.1.3. 1-β-D-Arabinofuranosyl-Cytosin (ara-C)

Zwei mögliche Mechanismen der DNS-Replikationshemmung durch ara-C werden diskutiert. Entweder verringert es die Polymeraseaktivität durch Anbindung an das Molekül oder es wird in die wachsende DNS-Kette eingebaut und verhindert damit nachhaltig die Schließung der Lücke (Block der Kettenverlängerung) (30). Die Folge ist eine Ansammlung von Strangbrüchen, die nach Zugabe von dCTP signifikant abnimmt, was auf

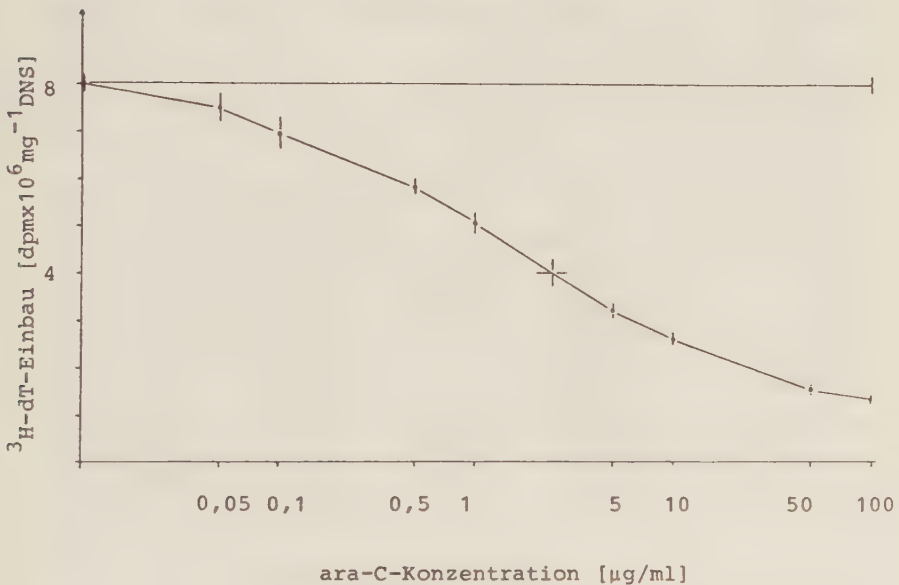


Abb.4.3.1.3.:

3
Semikonservativer H-dT-Einbau in die DNS in Abhängigkeit von der ara-C-Konzentration (≤ 100 μg/ml)

3

H-Einbau der Kontrolle: 8.029.394 dpm/mg DNS (+3,65 %)
1 Tier, 10 Ansätze zu je n=3.

einen Konkurrenzmechanismus des ara-CTP zu dCTP schließen läßt (30). Abb.4.3.1.3. zeigt die dosisabhängige Hemmung der SDS in Knochenmarkszellen durch verschiedene Konzentrationen von ara-C. Eine 50 % ige Hemmung wurde bei einer ara-C-Konzentration von 2,5 ug/ml ermittelt.

4.3.1.4. Hyperthermie

Wurden die Knochenmarkszellen 30', 37,5', 45' und 60 min lang bei 43 °C vorinkubiert und anschließend mit ^3H -dT bei

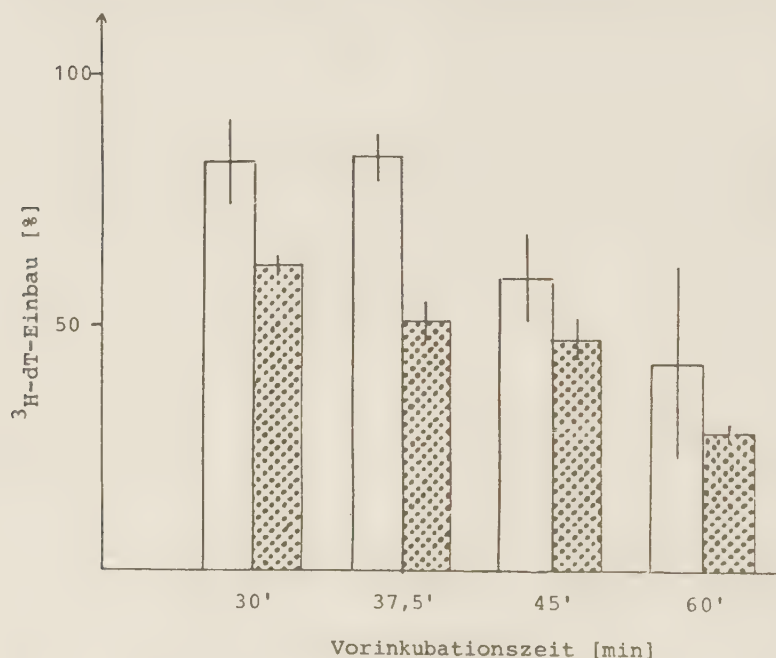


Abb.4.3.1.4.:

Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in die säurefällbare Fraktion der Knochenmarkszellen nach Hyperthermie (43 °C) (dunkle Säulen) im Vergleich mit den für Thymuszellen unter vergleichbaren Bedingungen von TEMPEL (107) ermittelten Werten (helle Säulen = Thymuszellen).
Einbau in Prozent, bezogen auf die bei 37 °C inkubierten Zellen. 1 Tier, 2 x 4 Ansätze zu je n=3. ^3H -Einbau der Kontrollen (Knochenmarkszellen): 7.812.866 dpm/mg DNS (+7,3%)

⁰37 °C markiert, kam es gegenüber den bei ⁰37 °C vorinkubierten Kontrollen zu einer mit der Dauer der Hyperthermiebehandlung zunehmenden Hemmung der DNS-Synthese um 39 % bis 72 % .

4.3.2. In vitro-Versuche zur unprogrammierten (reparaturbedingten) DNS-Synthese (UDS)

4.3.2.1. Novobiocin

Werden Thymuszellen in Gegenwart von Novobiocin in Konzentrationen von 400-900 µg/ml vorinkubiert, verdoppelt sich der im Anschluß daran gemessene "unprogrammierte" ³H-dT-Einbau, als dessen Mechanismus eine DNS-Polymerase-II vermittelte Reaktion wahrscheinlich ist (107). Eine Stimulierung der UDS konnte für Knochenmarkszellen jedoch nicht nachgewiesen werden. Vielmehr scheint der "unprogrammierte" ³H-dT-Einbau gegenüber den nichtsubstituierten Kontrollen bei einer Novobiocin-Konzentration von 900 µg/ ml um nahezu 50 % verringert zu sein, wie Abb.4.3.2.1. veranschaulicht.

Bei einer Konzentration von 3600 µg Novobiocin/ml konnte die UDS um ca. 95 % gehemmt werden. Sie verhielt sich demnach ähnlich wie in dem unter gleichen Bedingungen durchgeführten SDS-Versuch (Siehe 4.3.1.2.) .

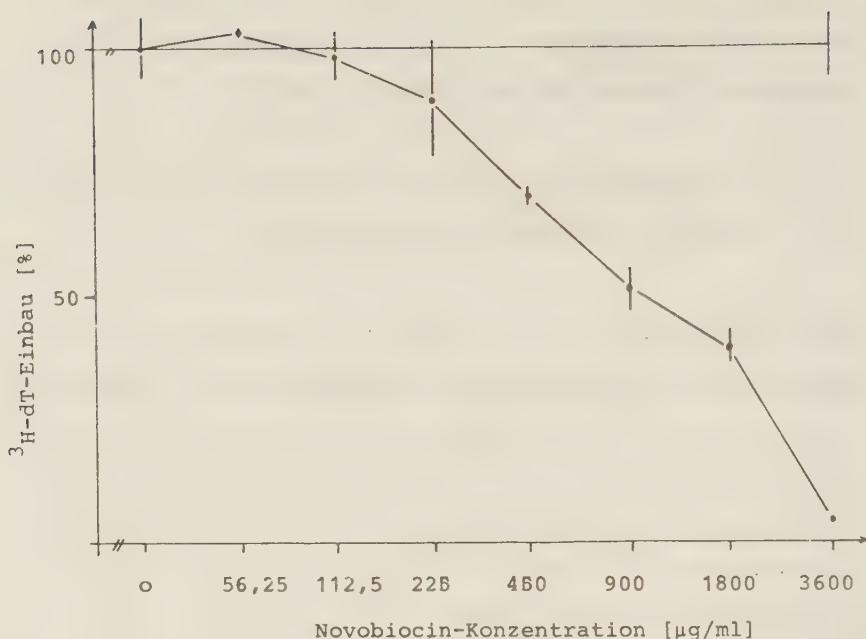


Abb.4.3.2.1.:

³

Unprogrammierter ³H-dT-Einbau in die DNS in Abhängigkeit von der Novobiocin-Konzentration (≤ 3600 µg/ml). Einbau in Prozent, bezogen auf die Kontrolle.

³

H-Einbau der Kontrolle: 720.273 dpm/mg DNS (± 6 %)
1 Tier, 8 Ansätze zu je n=3.

4.3.2.2. Nalidixinsäure

Nalidixinsäure ist (wie Novobiocin) ein Topoisomerase-II-Hemmstoff (107,30). Im Unterschied zu Novobiocin war Nalidixinsäure in der Lage, den "unprogrammierten" ³H-dT-Einbau im Konzentrationsbereich von 450 - 4500 µg/ml gegenüber der Kontrolle nur geringfügig- aber signifikant- zu erhöhen (Abb.4.3.2.2.).

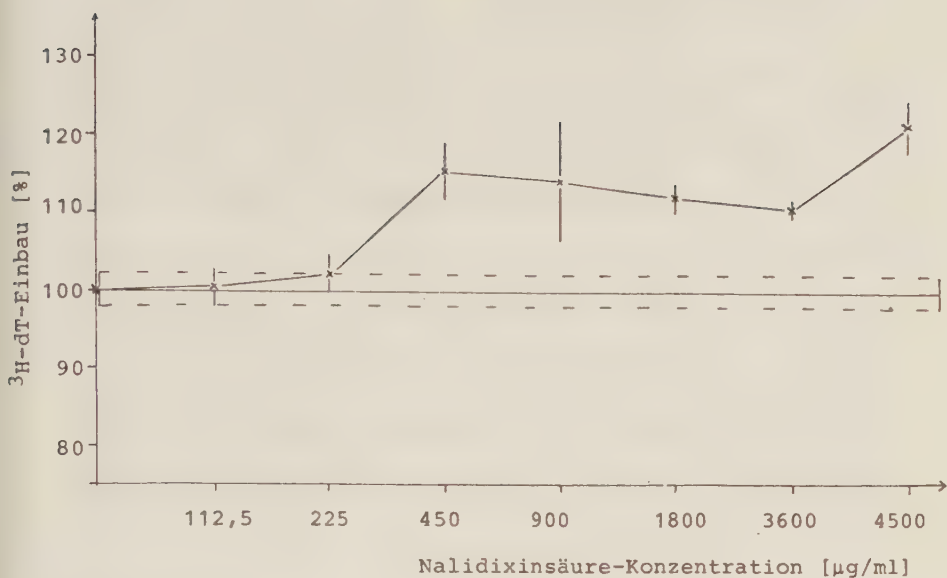


Abb.4.3.2.2.:

3

Unprogrammierter H-dT-Einbau in die DNS in Abhängigkeit von der Nalidixinsäure-Konzentration. Einbau in Prozent, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

3

H-Einbau der Kontrolle: 664.727 dpm/mg DNS ($\pm 2,7\%$)
2 Tiere, 8 Ansätze zu je n=6.

Die UDS der Nalidixinsäure-behandelten Zellen erhöhte sich gegenüber der Kontrolle um maximal 21 % . Dosisabhängigkeit bestand nicht.

4.4. Strahlenexposition in vitro

4.4.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung

Die in vitro-Bestrahlung der Zellen erfolgte direkt im Anschluß an ihre Gewinnung in einem Dosisbereich von 8-64 Gy (1,6 Gy/min). Dabei wurden die kürzer bestrahlten Proben sowie die unbestrahlten Kontrollproben solange auf Eis gehalten, bis die 40-minütige Bestrahlung der letzten Proben beendet war. Anschließend wurden 2 Zellreihen (Kontrolle + 4³ Bestrahlte, je n=3) sofort mit H-dT inkubiert (Versuch A); die übrigen Zellreihen wurden zunächst 1 h lang (Wartezeit) in frischer Hankslösung inkubiert und anschließend in der Hauptinkubation markiert (Versuch B). Abb.4.4.1. zeigt in

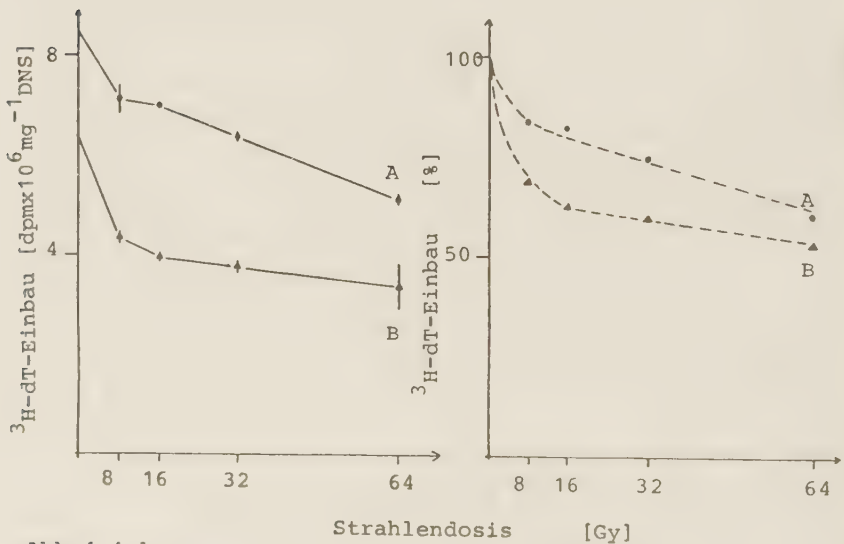


Abb.4.4.1.:

Absolute und prozentuale Darstellung des semikonservativen H-dT-Einbaus in die DNS nach in vitro Röntgenexposition (≤ 64 Gy), bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle.
A: Zellgewinnung sofort nach der Bestrahlung
B: Zellgewinnung nach 1-stündiger Wartezeit
1 Tier, 2 x 5 Ansätze zu je n=3.

beiden Versuchen einen zunächst (bis 8 Gy) steileren , anschließend flacheren Abfall des ³H-dT-Einbaus. Dabei war der ³H-dT-Einbau der strahlenexponierten Zellen in Versuch B aufgrund der längeren Inkubationszeit nach Exposition sowohl absolut als auch relativ im Vergleich zur Kontrolle stärker gehemmt als im Versuch A.

4.4.2. Röntgenbestrahlung in vitro und endogener Thymidinpool

Um beurteilen zu können, inwieweit die in Abb.4.4.1 ermittelte strahlenbedingte Hemmung der DNS-Synthese auf eine Veränderung (Expansion) des endogenen Thymidinpools zurückzuführen ist, wurde der Effekt nach Sättigung des Thymidinpools mit "kaltem" Thymidin (dT) untersucht.

Nach Bestrahlung der ersten Zellreihe (die Kontrolle lag solange auf Eis) wurden beide Zellreihen mit 0, 8, 16, 32 und 64 ug dT/ml vorinkubiert. Anschließend wurden das Medium gewechselt und die Zellen mit ³H-dT markiert. Abb.4.4.2.A zeigt eine gleichmäßige Verringerung der ³H-dT-Einbaurrate durch zunehmende Zusätze unmarkierten Thymidins sowohl in der scheinbestrahlten Kontrolle als auch in der bestrahlten Fraktion. Vergleicht man nun den Hemmeffekt der dT-unsubstituierten mit dem der dT-substituierten Zellreihe (mit 24 ug dT/ml ,ED₅₀), so wird deutlich, daß dieser Effekt durch Zugabe unmarkierten Thymidins nicht zu beeinflussen war, folglich nicht das Ergebnis einer strahlenbedingten Thymidinpoolveränderung sein konnte. Die DNS-Synthese-Hemmung lag -gegenüber den nicht-exponierten Kontrollen- in bestrahlten nicht-dT-substituierten Zellen bei 30 %, in bestrahlten dT-substituierten Zellen bei 39 %.

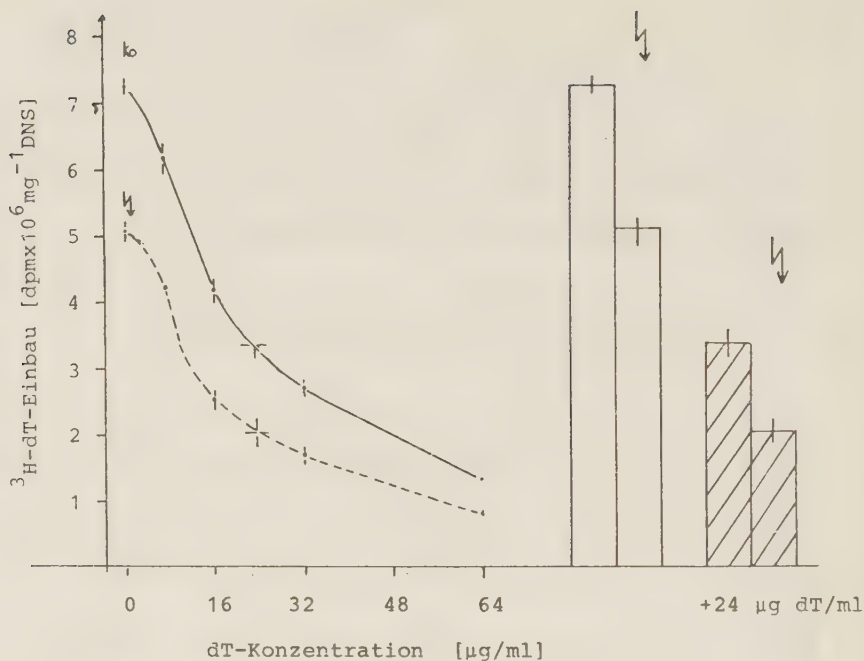


Abb.:4.4.2.A:

Strahleninduzierte, semikonservative ^3H -dT-Einbau-Hemmung unter dem Einfluß unterschiedlich hoher dT-Konzentrationen (8-64 $\mu\text{g/ml}$). Die schraffierten Säulen geben die für eine DE50 von 24 μg dT/ml ermittelten ^3H -Einbauwerte der Bestrahlten und der Kontrolle wieder. Die hellen Säulen kennzeichnen die dT-unbehandelten Vergleichsproben.

Die Bestrahlung erfolgte in-vitro mit einer Dosis von 64 Gy (1,6 Gy/min). 1 Tier, 2 Versuchsreihen, 2 x 5 Ansätze zu je $n=3$.

Zu den gleichen Ergebnissen kam man, wenn man die Zellen schon vor der Bestrahlung mit dT 30 min lang vorinkubierte und dieses Medium erst nach der Strahlenexposition wechselte (Abb.4.4.2.B: 34 % bzw. 43 % DNS-Synthese-Hemmung).

Dabei fiel jedoch die dT-bedingte Hemmung des ^3H -dT-Einbaus in die DNS aufgrund der verlängerten Vorinkubation insgesamt

höher aus (ca. 70 % statt der 50 % durch 24 μg dT/ml). Die in beiden Versuchen ermittelte DNS-Synthese-Hemmung lag mit 36,32 % (± 5.77 %, $n=12$) im Bereich der in 4.4.1. für 64 Gy gemessenen Werte.

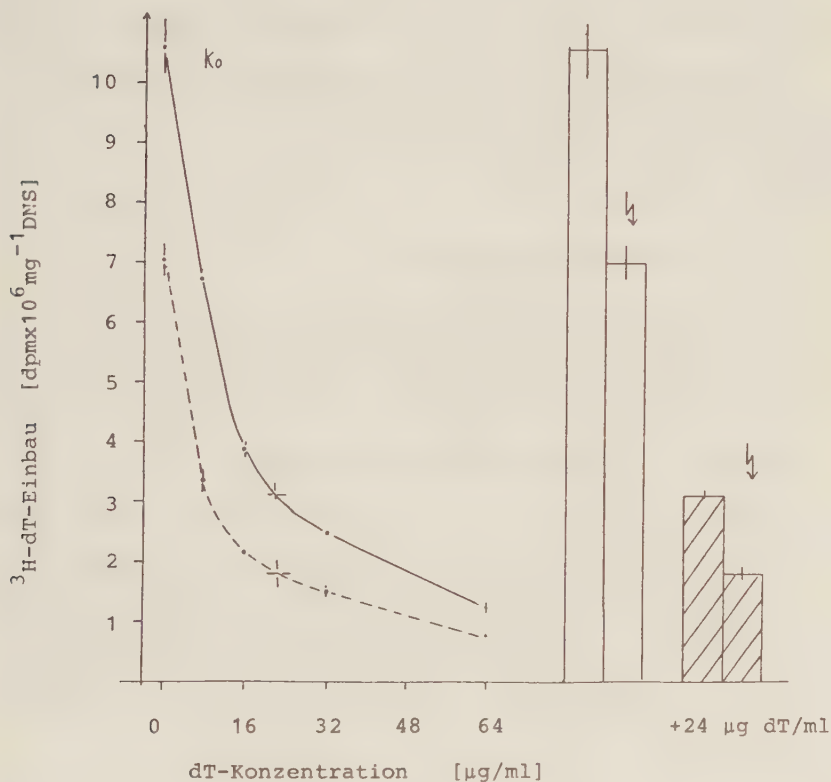


Abb.:4.4.2.B:

3

Strahleninduzierte, semikonservative ^3H -dT-Einbauhemmung unter dem Einfluß unterschiedlich hoher dT-Konzentrationen. Im Unterschied zu Abb.4.4.2.A wurde dem Medium das "kalte" dT schon vor der Strahlenexposition der Zellen zugegeben. Die Kennzeichnung der Säulendiagramme erfolgte wie in Abb.4.4.2.A beschrieben.

1 Tier, 2 Versuchsreihen, 2 x 5 Ansätze zu je $n=3$.

4.5. Strahlenexposition in vivo

4.5.1. Einfluß einer akuten Einzelbestrahlung auf die semikonservative DNS-Synthese (SDS)

1 Stunde nach in vivo-Strahlenexposition mit Dosen von 0,1 bis 8 Gy (0,8 Gy/min) wurden die exponierten Ratten und ihre scheinbestrahlten Kontrollen aufgearbeitet und- nach 30-minütiger Vorinkubation- 90 min lang im ³H-dT-haltigen Hanks-Medium inkubiert (1,25 uCi).

4.5.1.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung

Zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung bei akuter Ganzkörper³röntgenbestrahlung wurden die semikonservativen ³H-dT-Einbauwerte sämtlicher Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit herangezogen. Zu ihnen gehören auch die Kontrollen, die einer Scheinbestrahlung unterzogen worden waren, sowie die akutbestrahlten Tiere, die zuvor scheinbestrahlt worden waren, nachdem sich gezeigt hatte, daß die Scheinbestrahlung³ keinen Einfluß auf die Höhe der ³H-dT-Einbaurate auszuüben schien. Insgesamt wurden 16 Kontrolltiere und 59 bestrahlte Tiere ausgewertet.

Abb.4.5.1.1. zeigt eine biphasisch verlaufende Dosis-Wirkungs-Beziehung, die in ihrem Verlauf mit der bei in vitro-Bestrahlung erhaltenen vergleichbar ist (Abb.4.4.1.). Sie zeigt bis zu einer Dosis von ca. 2 Gy einen steilen Abfall³ der ³H-dT-Einbaurate, der anschließend bis zu einer Dosis von 8 Gy flach ausläuft. Durch Strahlenexposition mit 8 Gy konnte die SDS gegenüber den Kontrollen um rund 62 % gehemmt werden.

Anzahl der
Tiere:

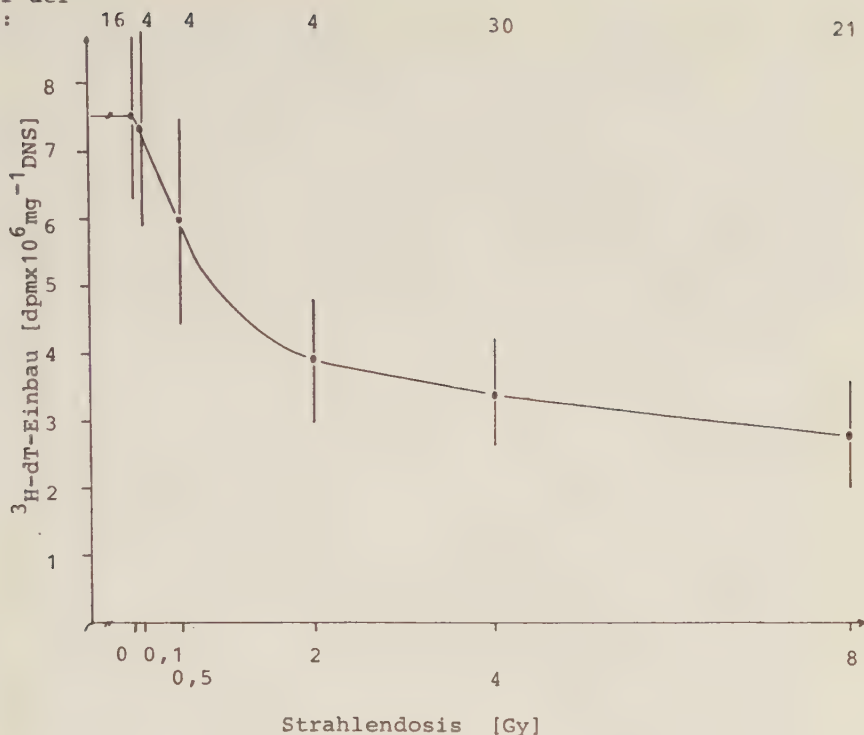


Abb.4.5.1.1.:

3

Semikonservativer ^3H -dT-Einbau in die DNS nach akuter Ganzkörperstrahlungsbestrahlung (≤ 8 Gy) dosisabhängig. Jeder Dosis-Wert stellt das arithmetische Mittel von 4 bis 30 Tieren zu je $n=3$ - und die Standardabweichung- dar. Die Tiere wurden 1 h nach Exposition aufgearbeitet.

3

- H-Einbau 1. der Kontrolle: 7.552.859 dpm/mg DNS
2. der mit 8 Gy Bestrahlten: 2.808.630 dpm/mg DNS

3

4.5.1.2. Einfluß der ^3H -dT-Markierungszeit auf die Dosis-Wirkungs-Beziehung

Abb.4.5.1.2. A - D zeigen, daß unterschiedlich lange Markierungszeiten (30 bis 120 min) keinen Einfluß auf den- nach verschiedenen hohen Strahlendosen von 0,1 , 1,5, 2 und 8 Gy - ermittelten Kurvenverlauf hatten; so wurde beispielsweise

die SDS nach Exposition mit 0,5 Gy zu jeder angegebenen Zeit um ca. 33 % $\pm 2,8$ % gegenüber den Kontrollen gehemmt.

Interessant ist, daß die ³H-dT-Einbaurrate der mit 0,1 Gy Bestrahlten um durchschnittlich 8 % über den scheinbestrahlten Kontrollen lag, eine signifikante "Stimulation" der SDS jedoch aufgrund der großen individuellen Schwankungen in den 4 Versuchsreihen (8 Tiere) nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte.

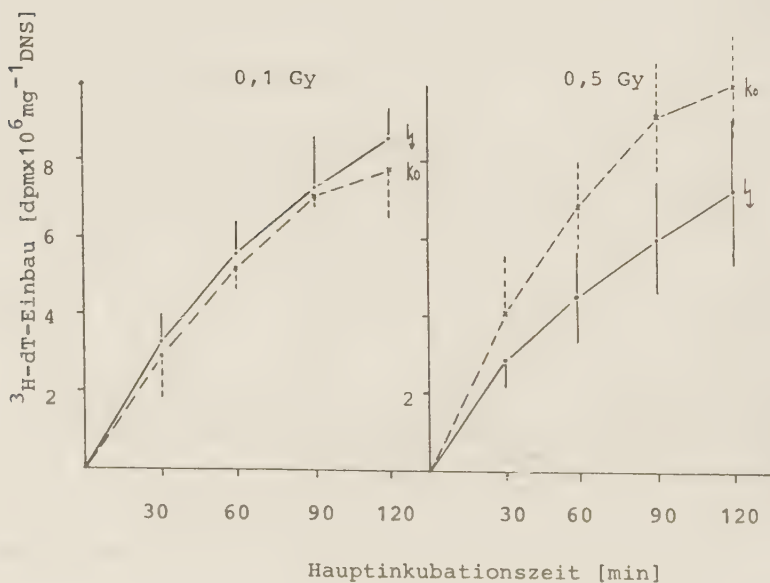


Abb.4.5.1.2.A u. B:

³
Semikonservativer ³H-dT-Einbau in die DNS nach akuter Ganzkörperröntgenbestrahlung (0,1 und 0,5 Gy) unter dem Einfluß unterschiedlich langer Markierungszeiten (30-120 min). Die Kontrollen sind durch die gestrichelten, die bestrahlten Tiere durch die durchgezogenen Linien gekennzeichnet. Je Dosis-Wert 8 Tiere, jeweils 2 x 4 Ansätze zu je n=3.

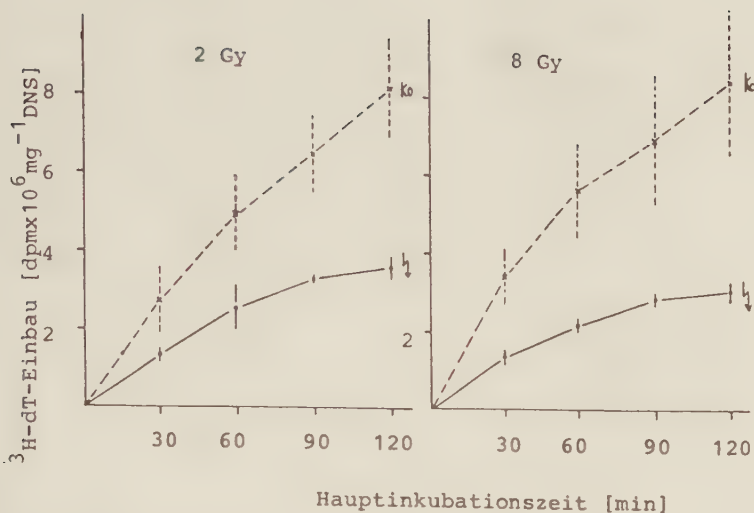


Abb.4.5.1.2.C u. D:

³
Semikonservativer $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNS nach akuter Ganzkörperstrahlungsbestrahlung (2 und 8 Gy) unter dem Einfluß unterschiedlich langer Markierungszeiten (Kennzeichnung siehe Abb.4.5.1.2.A u. B.). Je Dosis-Wert 6 Tiere, jeweils 2 x 4 Ansätze zu je n=3.

4.5.1.3. Prozentuale Abweichung der semikonservativen DNS-Synthese(SDS) nach Bestrahlung von den Kontrollwerten

Abb.4.5.1.3. zeigt nochmals die- nicht signifikante- "Stimulation" der SDS nach Exposition mit 0,1 Gy in diesen 4 Versuchsreihen, die -nach Auswertung aller ³ ^3H -Einbauwerte (Abb.4.4.1)- nicht bestätigt werden konnte.

Ab einer Strahlenexposition von 0,5 Gy konnte die SDS der Be- strahlten signifikant ($p < 0,05$) gegenüber den Kontrollen ge- hemmt werden (Abb.4.5.1.3).

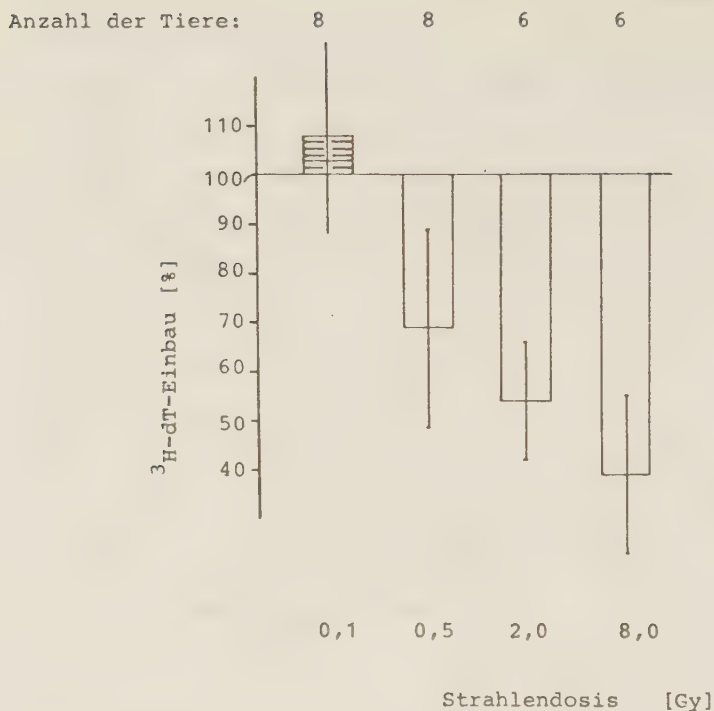


Abb.4.5.1.3.:

3

Semikonservativer $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNS nach akuter Ganzkörper-röntgenbestrahlung (0,1- bis 8 Gy) in Prozent, bezogen auf die Kontrollwerte. Im Säulendiagramm stellt jeder Dosis-Wert das arithmetische Mittel aus 3 bis 4 Tieren zu je $n=3$ -und die Standardabweichung -dar. Die dunkle Säule kennzeichnet die positive Abweichung von der Kontrolle nach 0,1 Gy.

4.5.1.4. Einfluß unmarkierten ("kalten") Thymidins auf den
 $^3\text{H-dT}$ -Einbau nach Bestrahlung

Ähnlich wie in vorangegangenen in vitro-Versuchen konnte kaltes Thymidin (dT) in Konzentrationen von $3-64 \text{ ug/ml}$ die durch 4 Gy erzeugte Hemmung des semikonservativen $^3\text{H-dT}$ -Einbaus in die DNS nicht beeinflussen (Abb.4.5.1.4.).

24 $\mu\text{g dT/ml}$ hemmen den ³H-dT-Einbau in die DNS um 50 %.

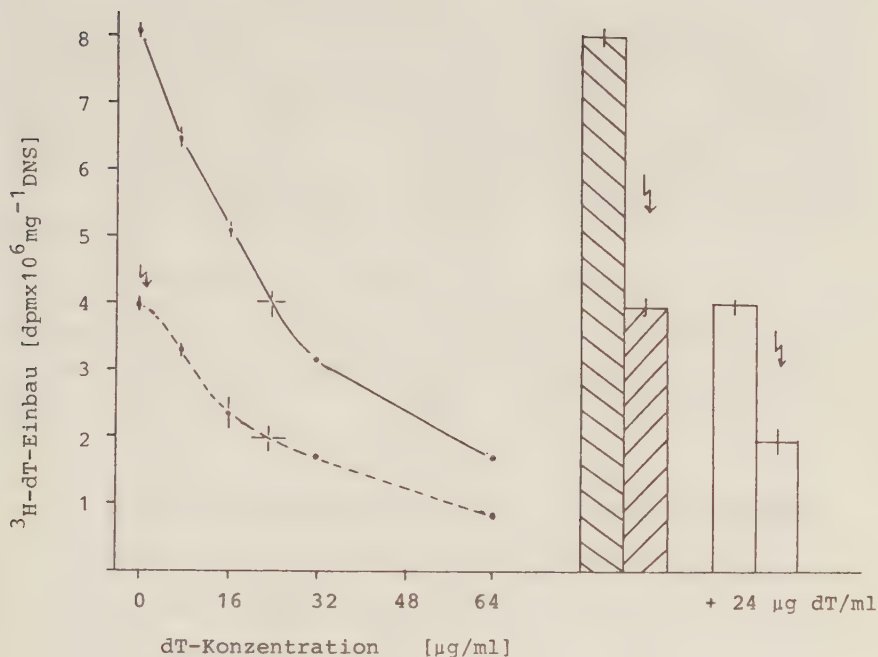


Abb.4.5.1.4.:

Strahleninduzierte, semikonservative ³H-dT-Einbau-Hemmung (nach 4 Gy) unter dem Einfluß unterschiedlich hoher dT-Konzentrationen (8-64 $\mu\text{g/ml}$). Die schraffierten Säulen kennzeichnen die dT-unbehandelten Vergleichsproben. Die hellen Säulen stellen die für eine DE von 24 $\mu\text{g dT/ml}$

ermittelten ³H-Einbauwerte der Bestrahlten und der Kontrolle dar. 2 Tiere, 2 x 4 Ansätze zu je n=3.

4.5.2. Einfluß fraktionierter Bestrahlung auf die semikonservative DNS-Synthese

Die Ratten wurden 4 Tage hintereinander jeden Morgen mit einer kleinen Röntgendosis (4 x 0,012 Gy oder 4 x 0,1 Gy) bestrahlt bzw. scheinbestrahlt und am (1.)3.(5.) Tag nach der letzten fraktionierten Dosis aufgearbeitet. Eine vorherige Akutbestrahlung erfolgte nicht.

Dabei zeigte sich, daß der semikonservative ³H-dT-Einbau

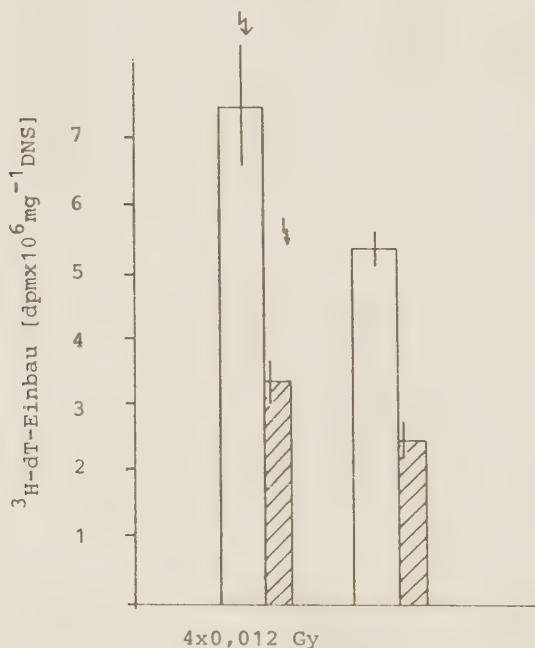


Abb.4.5.2.:

Semikonservativer ³H-dT-Einbau in die DNS 3 Tage nach fraktionierter Ganzkörperstrahlungsbestrahlung mit 4 x 0,012 Gy. Die gestrichelten Säulen kennzeichnen die ³H-Einbausraten der fraktioniertbestrahlten- und scheinbestrahlten Tiere unter dem Einfluß von kaltem Thymidin (24 µg/ml). 4 Tiere zu je n=6.

in die DNS der bestrahlten Tiere 1, 3 oder 5 Tage nach 4-maliger fraktionierter Bestrahlung mit 0,1 Gy gegenüber der Kontrolle um rund 15 % vermindert war (pro Tage-Wert 4 Tiere zu je n=6, nicht eigens dargestellt).

Demgegenüber konnte eine deutliche Erhöhung der semikonservativen ³H-dT-Einbaurate in die DNS der Bestrahlten 3 Tage nach 4-maliger fraktionierter Bestrahlung mit 0,012 Gy um rund 40 % (+17 %) gegenüber den Kontrollen ermittelt werden (Abb.4.5.2.).

Diese "Stimulierung" der SDS nach niedrigen Strahlendosen konnte durch Zugabe kalten Thymidins (24 ug/ml) nicht im Sinne einer Effektabschwächung beeinflusst werden (Abb.4.5.2.).

4.5.3. Semikonservative und unprogrammierte DNS-Synthese (SDS und UDS) in Knochenmarkszellen fraktioniert-vorbestrahlter Ratten unter dem Einfluß einer Akutbestrahlung in vivo

4.5.3.1. SDS; Vorversuche

Orientierende Untersuchungen der Arbeitsgruppe zur Stimulierung der "DNS-Synthese" in fraktioniert-ganzkörperstrahlten Ratten hatten ergeben, daß -für Milz- und Thymuszellen -eine gegenüber den Kontrollen verminderte ³H-dT-Einbau-Hemmung nach einer Akutbestrahlung (8 Gy) vor allem durch viermalige Bestrahlung an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit Dosen im Bereich von 0,0014 - 0,1 Gy auszulösen war. Dabei schienen sowohl der Zeitpunkt der Akutbestrahlung (1-5 Tage nach der Fraktionierung) als auch der Zeitpunkt der

Aufarbeitung der Tiere nach erfolgter Akutbestrahlung eine entscheidende Rolle zu spielen (Tabelle 2 und Abb.4.5.3.1.).

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, konnte eine gegenüber den Kontrollen verminderte Hemmung der ^3H -dT-Einbausraten dosisabhängig nur an einem -maximal an zwei Tagen- der o.g. Tage festgestellt werden und dies auch nur, sofern eine 1-stündige Wartezeit nach erfolgter Akutbestrahlung bis zur Aufarbeitung der Tiere eingehalten wurde, d.h., die Tiere nicht, wie Abb.4.5.3.1. verdeutlicht, sofort aufgearbeitet wurden. Dabei

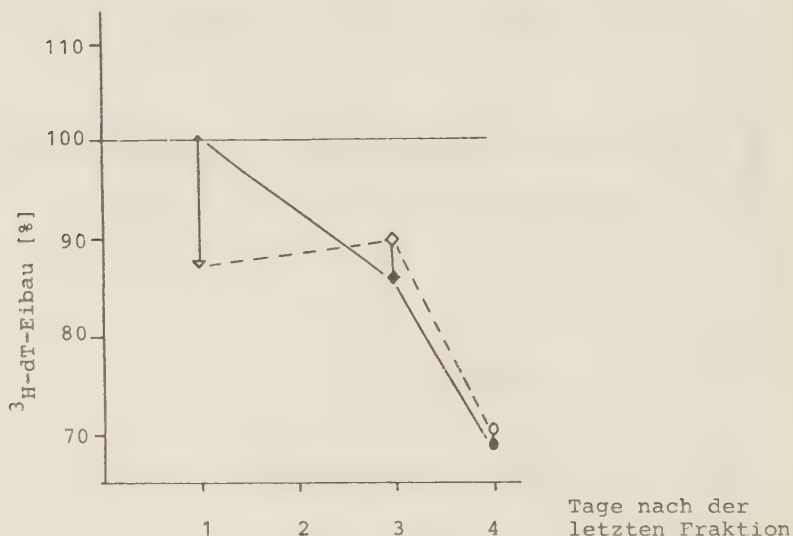


Abb.4.5.3.1.:

^3H - ^3H -dT-Einbau in die DNS von Knochenmarkszellen fraktioniert vorbestrahlter- und 1-4 Tage später akutbestrahlter Ratten bei Sofort-Aufarbeitung der Tiere, bezogen auf die Kontrollwerte. Die dunklen Punkte kennzeichnen die Zellreihe mit 30-minütiger Vorinkubation, die hellen Punkte die ohne Vorinkubation. Pro Tage-Wert 2-4 Tiere zu je $n=3$ bzw. $n=6$.

hatten die Vorinkubationszeiten von 30-bzw. 0 min keinen signifikanten Einfluß auf das qualitative Ergebnis, wohl lag der quantitative ³H-dT-Einbau der 30 min lang vorinkubierten Kontrollen jedoch um rund 18% über dem der nicht vorinkubierten Zellen (Abb.4.5.3.1.).

Tabelle 2: Vorversuche zum semikonservativen ³H-dT-Einbau in die DNS von Knochenmarkszellen fraktioniert vorbestrahlter und 1 - 7 Tage später akut bestrahlter Ratten. Aufarbeitung der Tiere 1 h nach der Akutbestrahlung. Angaben des ³H-dT-Einbaus in Prozent, bezogen auf die fraktioniert-scheinbestrahlten (aber akut exponierten) "Kontrollen".

Bestrahlungs- modus/Dosen	1	3	5	7	Tage nach Fraktionierung
4x0,0014 Gy + 8 Gy	<u>+31,69</u>	<u>+10,19</u>	-27,08		%
4x0,006 Gy 1. + 8 Gy	-37,45	-14,40	<u>+53,30</u>	-5,11	%
2.	<u>+29,10</u>	<u>+13,98</u>	-11,21		%
4x0,012 Gy + 8 Gy		-13,34	<u>+19,06</u>	-30,90	%
4x0,012 Gy 1. + 4 Gy		<u>+38,73</u>	+ 5,80 - - - -		%
2.		<u>+59,16</u>	- 8,89		%

Wie Tabelle 2 zeigt, konnten untereinander vergleichbare Ergebnisse an Knochenmarkszellen zunächst nicht erzielt werden. Ab dem 7. Tag war ein "Stimulierungseffekt" nicht mehr zu ermitteln. Offenbar trat dieser nach sehr kleinen Dosen, wenn vorhanden, früher ,d.h. bereits 1 Tag nach der letzten Fraktion, auf.

4.5.3.2. UDS; Vorversuche

Parallel zu den SDS-Versuchen wurde ein Teil der Knochenmarkszellen bestrahlter und scheinbestrahlter Ratten in HU-haltigem Hanks-Medium aufgearbeitet, um -nach HU-bedingter Hemmung der semikonservativen DNS-Synthese- Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Reparatursynthese an dem strahleninduzierten Effekt zu erhalten. Bei der ersten von drei Versuchsreihen wurde eine Stimulation für 4 x 0,006 Gy in

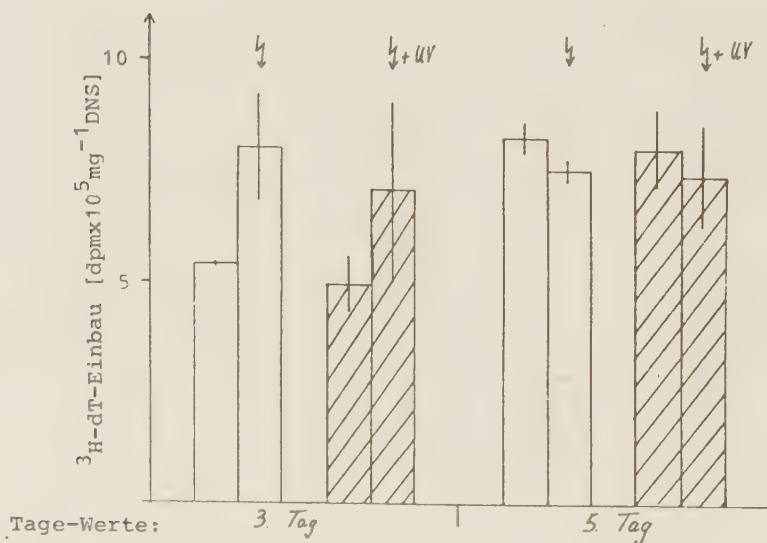


Abb.4.5.3.2.:

UDS 1. Einfluß einer in vivo-Akutbestrahlung fraktioniert-vorbestrahlter Ratten auf den unprogrammierten ^3H -dT-Einbau in die DNS der Knochenmarkszellen (helle Säulen). Die akute Exposition (8 Gy) erfolgte am 3. bzw. 5. Tag nach letzter Fraktionierung. 2. Einfluß einer in vitro-UV-Bestrahlung (32 Jxm^2) auf den Effekt (schraffierte Säulen). Pro Tage-Wert 2 Tiere, 4 Versuchsreihen zu je $n=3$.

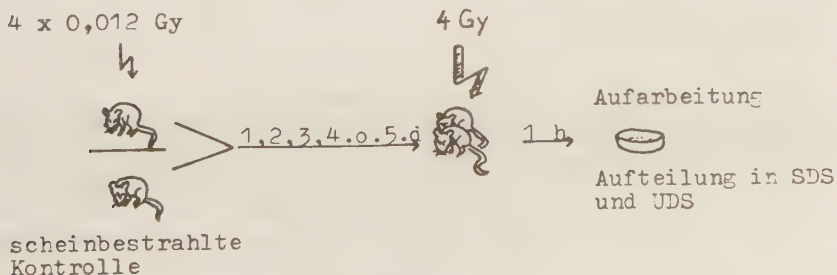
Kombination mit 8 Gy einen Tag später um 67 % gegenüber der scheinbestrahlten Kontrolle und drei Tage später um 38 % (nach der letzten fraktionierten Exposition) ermittelt. Fünf Tage später aufgearbeitete Knochenmarkszellen ergaben gegenüber der Kontrolle eine Hemmung von 28 % (Versuchsreihe 1 nicht eigens dargestellt).

Für die Versuchsreihen 2 und 3, in denen Ratten eine fraktionierte in vivo-Exposition von $4 \times 0,012$ Gy in Kombination mit 4 Gy drei- bzw. fünf Tage später erhalten hatten, konnte eine durchschnittliche Erhöhung der UDS um 48 % am 3. Tag und eine Hemmung der UDS um rund 9 % am 5. Tag gegenüber den Kontrollen ermittelt werden (Abb.4.5.3.2.).

Zusätzliche UV-Bestrahlung der Knochenmarkszellen hatte keinen Einfluß auf das Ergebnis (Abb.4.5.3.2. schraffierte Säulen).

4.5.3.3. SDS und UDS; Hauptversuche

Unter Berücksichtigung der Vorversuche wurden Fraktionen entsprechend $4 \times 0,012$ Gy zugrunde gelegt und mit einer 1 - 5 Tage später erfolgten Akutbestrahlung (4 Gy in vivo) kombiniert (Schema).



In Abb.4.5.3.3. I sind die prozentualen Abweichungen des semikonservativen (A) und unprogrammierten (B) ^3H -dT-Einbaus in die DNS der fraktioniert vorbestrahlten Ratten, bezogen auf die Kontrollwerte, an verschiedenen Tagen nach der letzten Fraktion dargestellt. In diesen Verteilungsmustern stellt jeder Punkt eine Versuchsreihe mit 2 Tieren (1 Bestrahltes + 1 Kontrolle) dar. Man erkennt, daß eine relative Erhöhung der semikonservativen (A) ^3H -dT-Einbaureate ("Stimulation") v. a. am 3.-und 4. Tag beobachtet werden konnte, wobei

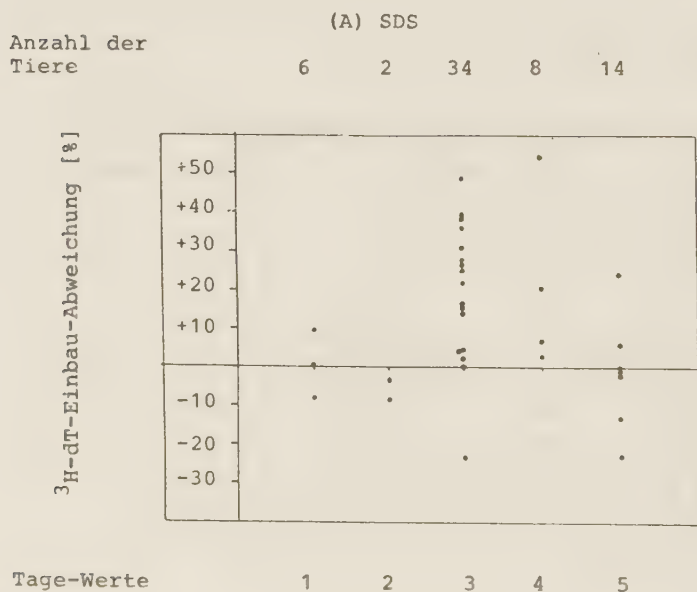


Abb.4.5.3.3. I A:

SDS; Prozentuale Abweichungen des semikonservativen ^3H -dT-Einbaus in die DNS der fraktioniert Vorbestrahlten, bezogen auf die Kontrollwerte, ca. 2 h nach einer Akutbestrahlung in vivo (1-, 2-, 3-, 4- und 5 Tage-Werte). Die Anzahl der Tiere pro Tage-Wert findet sich über der Abbildung.
*: 1 h Wartezeit + ca. 1 h Aufarbeitungszeit bis zur Markierung.

besser von "Verminderung" einer akut-strahleninduzierten
³

H-dT-Einbauhemmung in die DNS fraktioniert-vorbestrahlter
 Ratten gesprochen werden sollte, da diese mit einem ³H-Einbau
 von rund 3.800.000 dpm/mg DNS (Abb.4.5.3.3. III) gegenüber
nicht-akut-bestrahlte Ratten- mit einem ³H-dT-Einbau von
 rund 7.500.000 dpm/mg DNS -immer noch recht deutlich ausfiel
 (Abb.4.5.1.1.,Seite 63).

Bezüglich der UDS erkennt man , daß eine Erhöhung des unpro-
 grammierten ³H-dT-Einbaus in die DNS -wenn überhaupt- v.a. am
 ersten und dritten Tag auftrat (Abb.4.5.3.3. I B).

(B) UDS

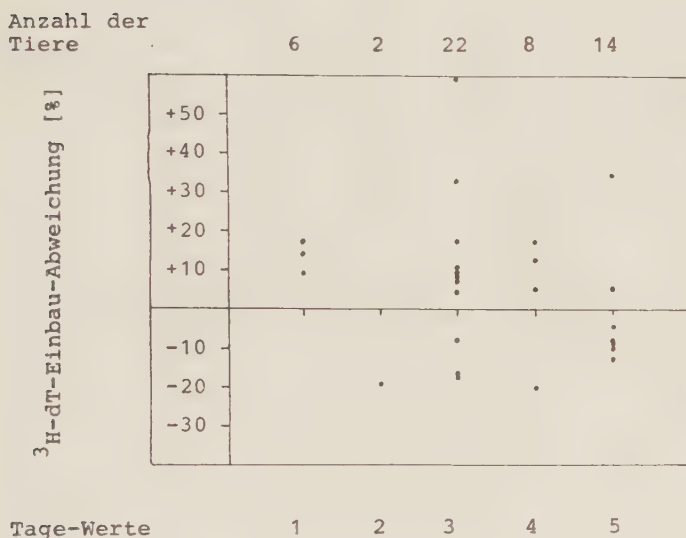


ABB.4.5.3.3. I B:

UDS; Prozentuale Abweichungen des unprogrammierten ³H-dT-Einbaus in die DNS der fraktioniert Vorbestrahlten ,bezogen auf die Kontrollwerte, ca 2 h nach einer Akutbestrahlung in vivo (1-,2-,3-,4- und 5 Tage-Werte). Die Anzahl der Tiere pro Tage-Wert finden sich über der Abbildung.

Zum besseren Vergleich wurden in Abb.4.5.3.3. II jeweils die Verteilungspunkte der Tage-Werte der SDS arithmetisch gemittelt (helle Säulen) und den jeweiligen Mittelwerten der UDS gegenübergestellt (schraffierte Säulen). Man erkennt, daß der strahleninduzierte Effekt ab dem 5. Tag sowohl für die SDS als auch für die UDS nicht mehr ermittelt werden konnte. Aufgrund der hohen Standardabweichungen von durchschnittlich $\pm 16\%$ konnten -bezüglich der SDS -nur die 3- und 4 Tage-Werte

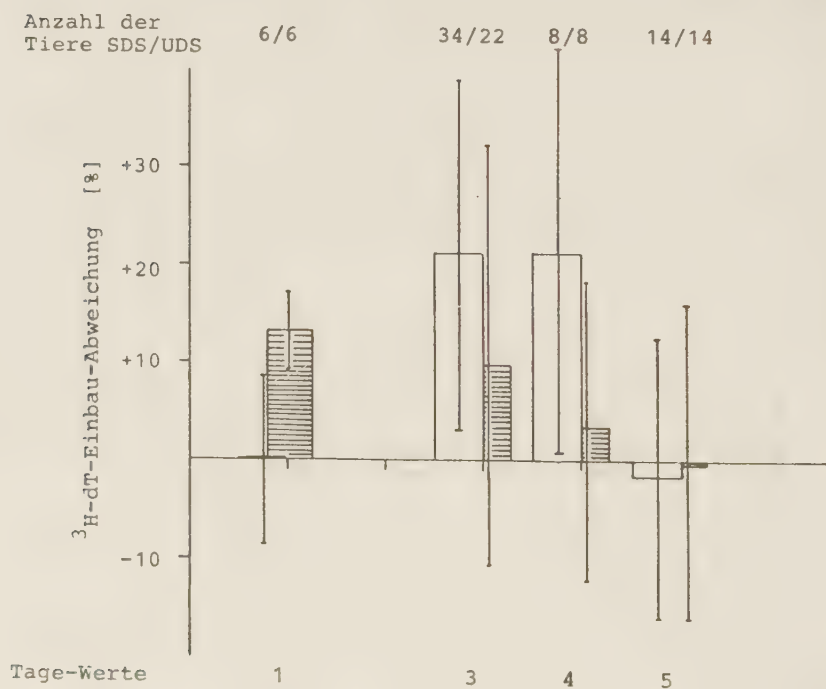


Abb.4.5.3.3. II:

SDS und UDS; Gegenüberstellung der in den beiden vorherigen Abbildungen dargestellten Tage-Werte nach Berechnung des arithmetischen Mittelwertes und der Standardabweichung aus den Verteilungspunkten jeweils eines Tage-Wertes. Helles Säulendiagramm: SDS, dunkles Säulendiagramm: UDS.

aus insgesamt 21 Bestrahlten und 21 Kontrollen ausgewertet werden (Abb.4.5.3.3. III). Dabei wurde festgestellt, daß am 3. und/oder 4.Tag die durch eine Strahlendosis von 4 Gy induzierte Hemmung des semikonservativen ^3H -dT-Einbaus in die DNS der Knochenmarkszellen der mit $4 \times 0,012$ Gy fraktioniert-vorbestrahlten Ratten gegenüber den fraktioniert-scheinbestrahlten Kontrollen um 17 % signifikant vermindert war ($p < 0,05$ für $n=21$) (Abb.4.5.3.3. III).

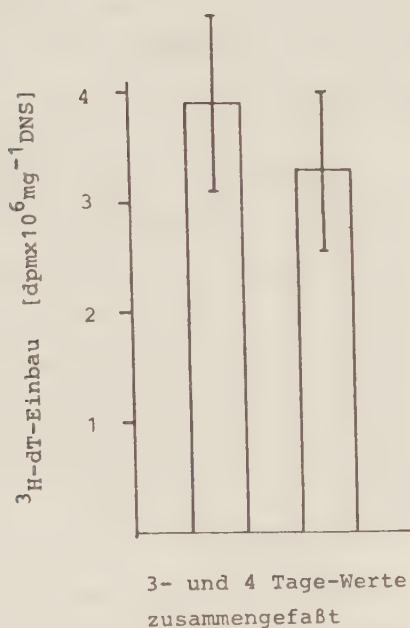


Abb.4.5.3.3. III:

SDS; Einfluß einer Akutbestrahlung in vivo auf den semikonservativen ^3H -dT-Einbau in die DNS der Knochenmarkszellen fraktioniert-vorbestrahlter Ratten im Vergleich zur fraktioniert-scheinbestrahlten Kontrollen. 3- und 4 Tage-Werte, 1 h Wartezeit. 42 Tiere zu je $n=3$.

H-Einbau Bestrahlte: $3.878.074 \text{ dpm/mg DNS}$ (+20 %)

H-Einbau Kontrolle : $3.313.172 \text{ dpm/mg DNS}$ (+18 %)

Abschließend sei erwähnt , daß o.g. Effekt nach einer in vitro-Akutbestrahlung unter sonst gleichen Bedingungen nicht nachzuvollziehen war. Hierzu wurden die Ratten mit $4 \times 0,012$ Gy fraktioniert vorbestrahlt, 3 Tage später aufgearbeitet, und die Knochenmarkszellen einer in vitro-Strahlenexposition von 64 Gy unterzogen. Die 1 h Wartezeit bis zu ihrer Weiterverarbeitung verblieben die Zellen in reinem Hanks-Medium (4 Tiere zu je $n=3$, nicht eigens dargestellt).

4.5.3.4. Zusatzanalysen: Einfluß einiger Testsubstanzen auf den durch fraktionierte Bestrahlung (3 Tage-Werte) veränderten ³H-dT-Einbau

Um Hinweise auf die möglichen Ursachen der in 4.5.3.3. dargestellten strahleninduzierten Effekte zu erhalten, wurde ein Teil der aufgearbeiteten Zellen aus den Hauptversuchen 30 min lang mit verschiedenen Testsubstanzen inkubiert (Vorinkubation) und anschließend- nach Wechsel des Mediums- mit ³H-dT markiert (zur gleichen Zeit wurden die nicht-behandelten Zellreihen in reinem Hanks-Medium inkubiert). Dabei sollten zum einen durch Auffüllung des Thymidinpools mit kaltem dT evtl. strahleninduzierte Veränderungen in der dTTP-Pool-Größe, zum anderen die Möglichkeit der Beteiligung einiger Enzyme am Zustandekommen der beschriebenen Effekte durch Zugabe spezifischer Enzymhemmstoffe (ara-C, Novobiocin, Nalidixinsäure) untersucht werden.

4.5.3.4.1. SDS unter dem Einfluß kalten Thymidins (dT)

Wurde ein Teil der Knochenmarkszellen fraktioniert-vorbestrahlter Ratten bzw. der fraktioniert-scheinbestrahlten Tiere mit 24 μg dT/ml vorinkubiert, konnte die im Vergleich zur fraktioniert-scheinbestrahlten Kontrolle gegebene Erhöhung des semikonservativen ^3H -dT-Einbaus in die DNS nach einer in vivo-Akutbestrahlung aufgehoben werden (Abb.4.5.3.4.1.).

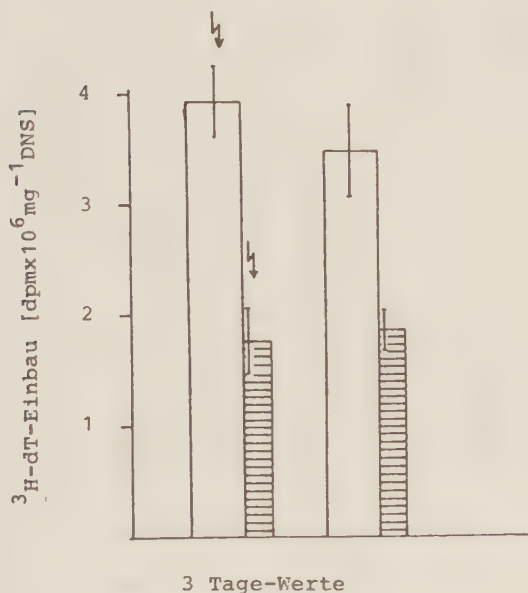


Abb.4.5.3.4.1.:

3
SDS; Einfluß von dT auf den semikonservativen ^3H -dT-Einbau in die DNS der Knochenmarkszellen fraktioniert-vorbestrahlter Ratten nach einer Akutbestrahlung im Vergleich zur scheinbestrahlten Kontrolle (3 Tage-Werte). Die schraffierten Säulen kennzeichnen die mit 24 μg dT/ml behandelten Zellen. Bestrahlungsmodus wie unter 4.5.3.3. beschrieben. 10 Tiere zu je n=3.

4.5.3.4.2. SDS unter dem Einfluß von ara-C

Nach Inkubation der fraktioniert-vorbestrahlten und der scheinbestrahlten Knochenmarkszellen mit 25 - 200 $\mu\text{g ara-C/ml}$ konnte die $^3\text{H-dT}$ -Einbaurrate beider Zellfraktionen -nach einer in vivo-Akuthbestrahlung -dosisabhängig gehemmt werden (Abb.4.5.3.4.2. I).

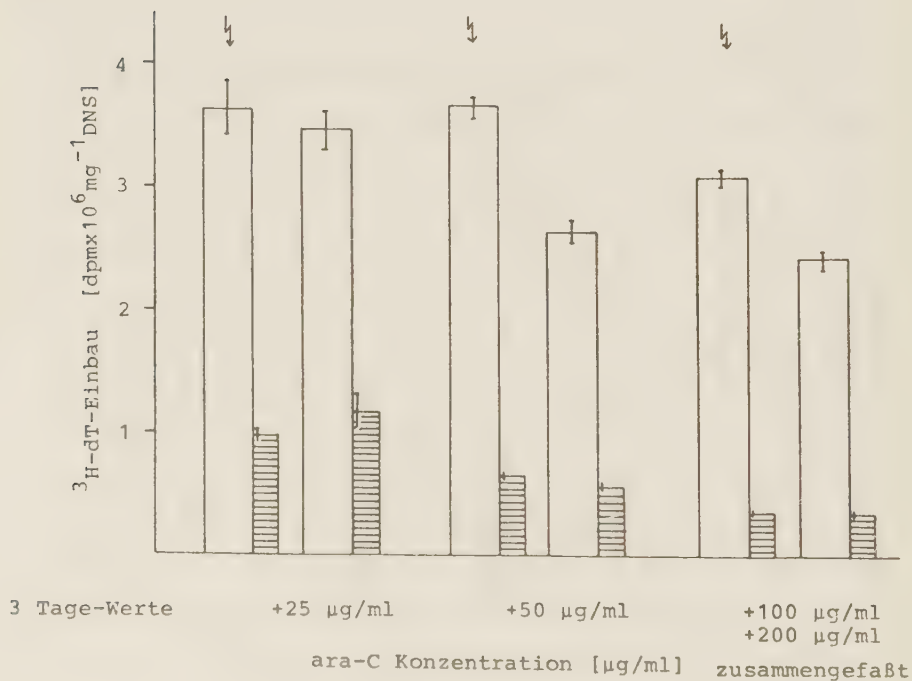


Abb.4.5.3.4.2. I:

SDS; Einfluß von ara-C (25-200 $\mu\text{g/ml}$) auf den semikonservativen $^3\text{H-dT}$ -Einbau in die DNS der Knochenmarkszellen fraktioniert vorbestrahlter Ratten nach einer in vivo-Akuthbestrahlung im Vergleich zur scheinbestrahlten Kontrolle (3 Tage-Werte). Die schraffierten Säulen kennzeichnen die mit 25, 50, 100 und 200 $\mu\text{g ara-C/ml}$ behandelten Zellen. Bestrahlungsmodus siehe 4.5.3.3. ; 8 Tiere zu je $n=3$.

Dabei wurde der strahleninduzierte Effekt durch ara-C aufgehoben (Abb.4.5.3.4.2. I).

In den 4 Versuchsreihen konnte der ³H-dT-Einbau in die DNS der fraktioniert-Scheinbestrahlten -nach einer zusätzlichen in vivo-Akutbestrahlung- durch ara-C um durchschnittlich 4,7 % gegenüber den fraktioniert-vorbestrahlten Ratten weniger gehemmt werden (Abb.4.5.3.4.2. II).

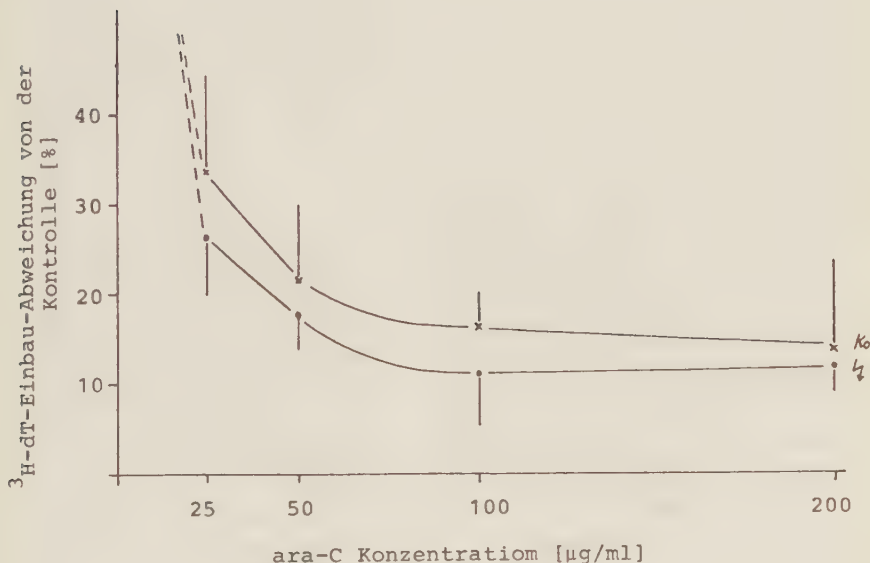


Abb.4.5.3.4.2. II:

SDS; Prozentuale Abweichung des semikonservativen ³H-dT-Einbaus in die DNS der fraktioniert-Vorbestrahlten nach ara-C-Einwirkung, bezogen auf die -ebenfalls mit ara-C behandelten-scheinbestrahlten Kontrollen ca. 2 h nach der in vivo-Akutbestrahlung (3 Tage Werte). Bestrahlungsmodus und ara-C-Konzentrationen siehe 4.5.3.4.2. I.

8 Tiere zu je n=3.

4.5.3.4.3. UDS unter dem Einfluß von Nalidixinsäure

Durch Inkubation der fraktioniert-vorbestrahlten und der scheinbestrahlten Knochenmarkszellen mit 900-1800 µg Nalidixinsäure/ml konnte der unprogrammierte (reparaturbedingte) ³H-dT-Einbau in die DNS beider Zellfraktionen -nach einer in-vivo-Akutbestrahlung Kontrollen -dosisunabhängig stimuliert werden. Dabei blieb der Unterschied zwischen den Vergleichsproben erhalten (Abb.4.5.3.4.3.).

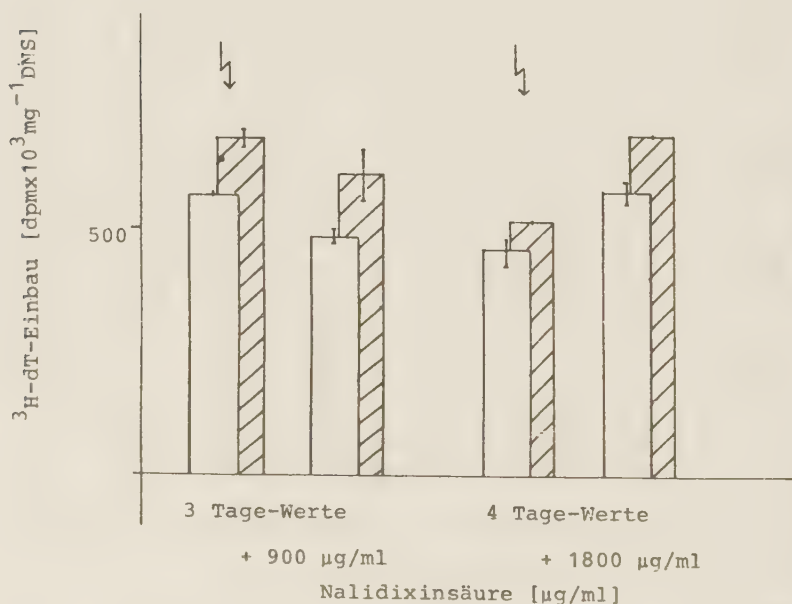


Abb.4.5.3.4.3.:

UDS; Einfluß von Nalidixinsäure auf den unprogrammierten (reparaturbedingten) ³H-dT-Einbau in die DNS der Knochenmarkszellen fraktioniert-vorbestrahlter Ratten im Vergleich zu den fraktioniert-scheinbestrahlten Kontrollen nach einer in vivo-Akutbestrahlung (3- und 4 Tage-Werte). Die schraffierten Säulen kennzeichnen die mit Nalidixinsäure (900-1800 µg/ml) vorbehandelten Zellen. Bestrahlungsmodus siehe 4.5.3.3.; 4 Tiere zu je n=3.

4.5.3.4.4. UDS unter dem Einfluß von Novobiocin

Wie Abb.4.5.3.4.4. zeigt, konnten 225 μg Novobiocin/ml den unprogrammierten (reparaturbedingten) ^3H -dT-Einbau in die DNS sowohl der fraktioniert-vorbestrahlten- als auch der fraktioniert-scheinbestrahlten Ratten gleichermaßen um ca. 30 % -nach einer in vivo-Akutbestrahlung -hemmen. Auch hier fielen die Substanz-Effekte bei beiden Fraktionen gleich aus.

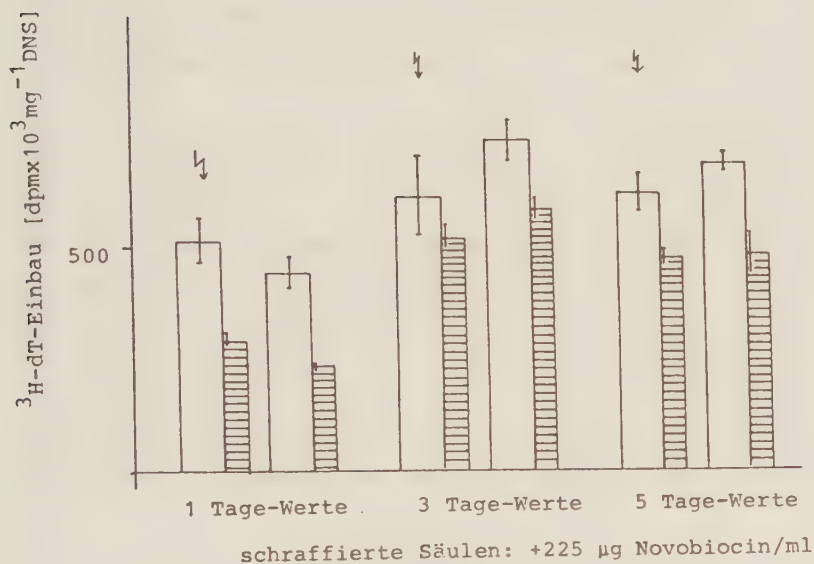


Abb.4.5.3.4.4.:

UDS; Einfluß von Novobiocin (225 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf den unprogrammierten (reparaturbedingten) ^3H -dT-Einbau in die DNS fraktioniert-vorbestrahlter Ratten im Vergleich zu den fraktioniert-scheinbestrahlten Kontrollen -nach einer in vivo-Akutbestrahlung. Die schraffierten Säulen kennzeichnen die mit Novobiocin vorbehandelten Zellen. Bestrahlungsmodus siehe 4.5.3.3.; 6 Tiere zu je $n=3$.

4.6. Nukleoidsedimentation

Eine intakte DNS ist Voraussetzung für eine ungestört ablaufende semikonservative DNS-Synthese (49,64). Demzufolge ist die Dauer einer strahleninduzierten DNS-Synthese-Hemmung durch ein gut funktionierendes Reparatursystem beeinflussbar (60,111).

Die Methode der Nukleoidsedimentation sollte Aufschluß darüber geben, ob eine möglicherweise fraktioniert-strahleninduzierte "Konditionierung" der DNS-Reparaturvorgänge an der verminderten ³H-dT-Einbauhemmung in die DNS fraktioniert-vorbestrahlter Ratten -nach einer in vivo-Akutbestrahlung- beteiligt sein könnte (3.3.5., S.36).

Dazu wurden zunächst -nach Erstellen einer Strahlendosis-Wirkungskurve für Dosen von 0,8-12,8 Gy in vitro (Abb.4.6.1)- die Reparaturkapazität der Knochenmarkszellen innerhalb der ersten 32 min nach erfolgter Akutbestrahlung mit 6,4 Gy in vitro untersucht (Abb.4.6.2.) und anschließend diese mit der Reparaturkapazität der Knochenmarkszellen zuvor fraktioniert-vorbestrahlter Ratten -7,5 min nach einer in vitro-Akutbestrahlung mit 6,4 Gy- verglichen (1-5 Tage-Werte) (Abb.4.6.4).

4.6.1. DNS-Schädigung in Abhängigkeit von der Strahlendosis

Nach in vitro-Bestrahlung von 6 Zellreihen mit 0,0 , 0,8, 1,6, 3,2, 6,4 bzw. 12,8 Gy (1,6 Gy/min) und anschließender sofortiger Lysierung (die kürzer bestrahlten Zellreihen wurden solange auf Eis gehalten) konnte eine dosisabhängige Verkürzung der Sedimentationsstrecken ermittelt werden.

Diese vollzog sich -ähnlich den bisherigen Versuchsergebnissen zur Akutbestrahlung- biphasisch. Einer starken Verkürzung der Sedimentationsstrecke bis zu einer Dosis von 1,6 Gy folgte eine zunehmend schwächer werdende Verkürzung der Sedimentationsstrecke bis zu einer Maximal-Dosis von 12,8 Gy (Abb.4.6.1.).

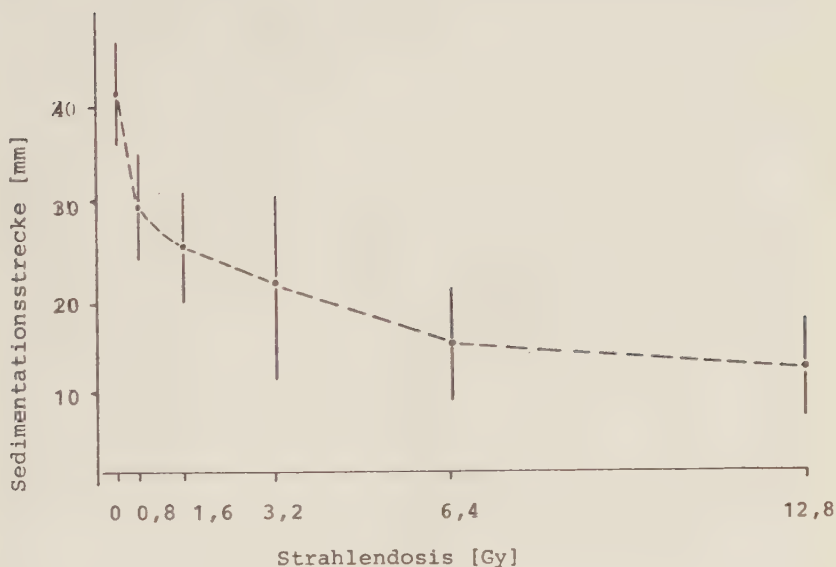


Abb.4.6.1.:

Nukleoidsedimentation in Abhängigkeit von der Strahlendosis (0,0 - 12,8 Gy in vitro). Jeder Dosis-Wert stellt eine Sedimentation dar. Die Standardabweichung eines jeden Dosis-Wertes gibt die Breite seiner Sedimentationsbande an. 1 Tier, 6 Sedimentationen zu je $n=1$.

4.6.2. Reparatur der DNS-Schäden in Abhängigkeit von der Nachinkubationszeit

Zur Bewertung der Reparaturkapazität wurden die Knochenmarkszellen -nach Akutbestrahlung bei 0 °C in vitro (6,4 Gy)- unterschiedlich lang (3', 4', 8', 16' und 32 min) in frischem Hanks-Medium bei 37 °C nachinkubiert und anschließend lysiert. Wie Abb.4.6.2. I zeigt, erhöhte sich die Sedimentationsstrecke in den ersten 8 min nach Strahlenexposition stärker als in

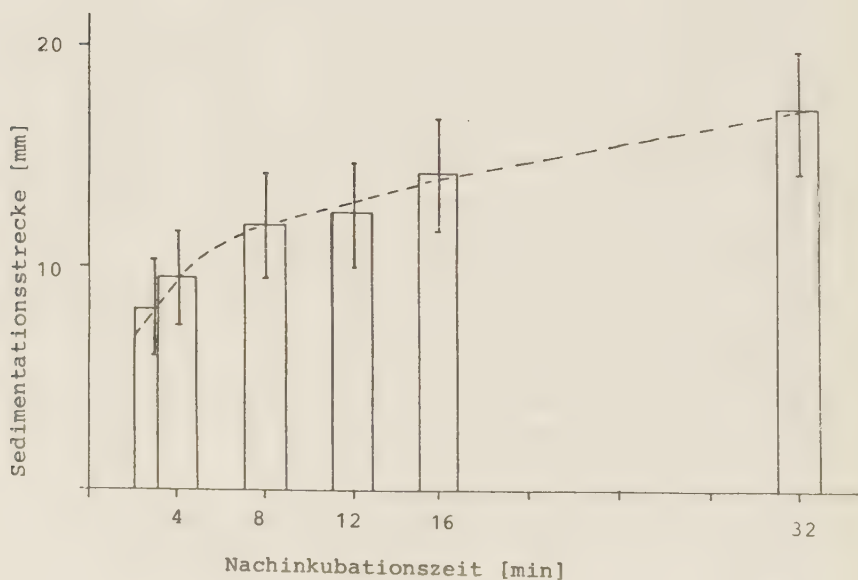


Abb.4.6.2. I:

Nukleoidsedimentation nach einer in vitro-Akutbestrahlung von Knochenmarkszellen (6,4 Gy) in Abhängigkeit von der Nachinkubationszeit (3 bis 32 min). Jeder Zeit-Wert stellt eine Sedimentation dar. Die Standardabweichung eines jeden Zeit-Wertes gibt die Breite seiner Sedimentationsbande an. 1 Tier, 6 Sedimentationen zu je n=1.

den nachfolgenden Minuten, was auf eine hohe Reparaturkapazität der Knochenmarkszellen in den ersten Minuten schließen läßt. Offensichtlich verlief die Reparatur der Restschäden erheblich langsamer (Abb.4.6.2. I). Vergleicht man nun die Sedimentationsstrecken unmittelbar und 7,5 min nach der *in vitro*-Akutbestrahlung lysierter Knochenmarkszellen mit der Sedimentationsstrecke unbestrahlter Knochenmarkszellen (Kontrolle), so zeigte sich, daß nach 7,5-minütiger Inkubation

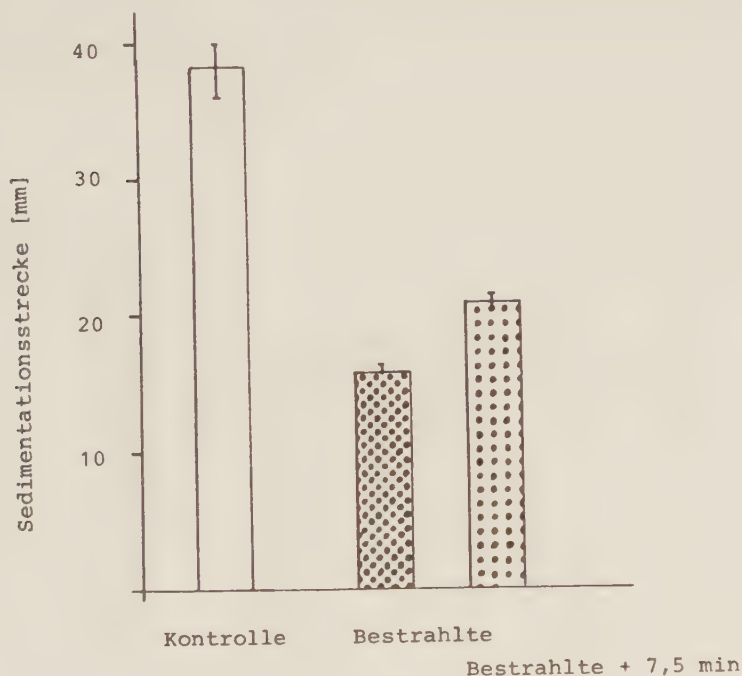


Abb.4.6.2. II:

Nukleoidsedimentation; Sedimentationsstrecken unmittelbar (stark gepunktete Säule)- und 7,5 min nach (gepunktete Säule) einer Akutbestrahlung *in vitro* (6,4 Gy) lysierter Knochenmarkszellen im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (helle Säule). Die Säulendiagramme stellen das arithmetische Mittel von jeweils 2 Sedimentationen mit Standardabweichung dar. 1 Tier, 3 Sedimentationen zu je $n=2$.

bereits 24 % der DNS-Schäden repariert werden konnten (Abb.4.6.2. II).

4.6.3. Einfluß einer in vitro-Akutbestrahlung auf die Reparaturkapazität von in vivo fraktioniert-vorbestrahlten Knochenmarkszellen

Hierzu wurden jeweils 2 Ratten zu den unter 4.5.3.3. beschriebenen Bedingungen fraktioniert-vorbestrahlt bzw. -scheinbestrahlt und 1 - 5 Tage danach aufgearbeitet. Nach

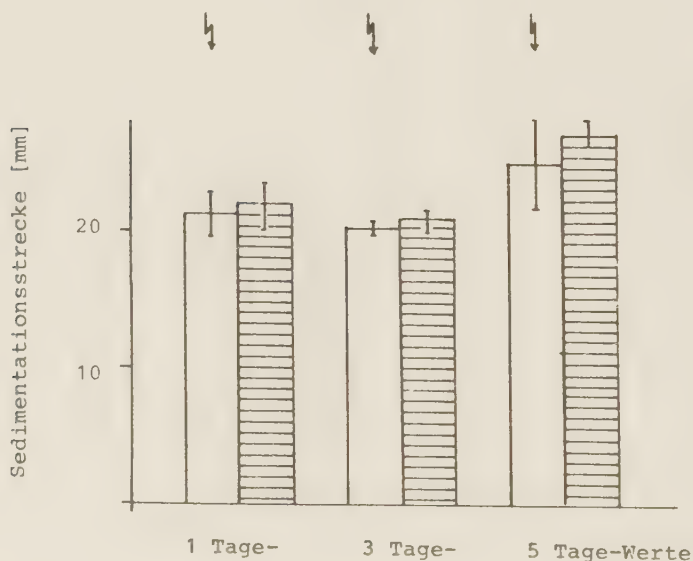


Abb.4.6.3.:

Nukleoidsedimentation; Einfluß einer in vitro-Akutbestrahlung von Knochenmarkszellen (6,4 Gy) auf die Sedimentationsstrecke fraktioniert-vorbestrahlter Ratten nach 7,5-minütiger Inkubationszeit (schraffierte Säulen) im Vergleich zu den fraktioniert-scheinbestrahlten Kontrollen. Die Säulendiagramme stellen das arithmetische Mittel aus jeweils 3 Sedimentationen mit Standardabweichung dar. 6 Tiere, 3 x 2 Sedimentationen zu je n=3.

in vitro-Akutbestrahlung mit 6,4 Gy wurden die Ansätze 7,5 min lang nachinkubiert und anschließend lysiert. Innerhalb dieser Zeit konnte keine Erhöhung der Sedimentationsstrecke der fraktioniert-vorbestrahlten Zellen gegenüber den fraktioniert-scheinbestrahlten Kontrollen festgestellt werden (Abb.4.6.3.).

5. DISKUSSION

5.1. Mögliche Ursachen der strahleninduzierten

DNS-Synthese-Hemmung.

Die wiederholt bestätigte (5,85 u.a.) biphasisch verlaufende Dosis-Wirkungsbeziehung der strahleninduzierten DNS-Synthese-Hemmung zeigte sich auch bei den eigenen in vivo- und in vitro-Untersuchungen (Abb.:4.4.1.,4.5.4.1.,4.6.1). Ein gegen-³über den in vivo-Versuchen höherer H-dT-Einbau in die DNS der Knochenmarkszellen nach der Bestrahlung in vitro ist möglicherweise auf eine in vivo stärkere Verdünnung des Tracers durch (metabolisch) zugeführtes kaltes dT zurückzuführen. Ab einer Dosis von 0,5 Gy wurde der semikonservative³ H-dT- Einbau in die DNS signifikant ($p < 0,05$) gehemmt (Abb.4.5.1.3.). Der Mechanismus der DNS-Synthese-Hemmung nach Einwirkung ionisierender Strahlen konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden.

Folgende Faktoren können ursächlich beteiligt sein:

1. Störung des Thymidintransports in die Zelle sowie Hemmung der Thymidinphosphorylierung ,
2. Veränderungen im Vorstufen-Pool und im Energiehaushalt überhaupt,
3. Hemmung der an der DNS-Synthese unmittelbar beteiligten Enzymaktivitäten sowie Störung ihrer Neubildung,
4. Schäden an der DNS selbst und/oder in der sie umgebenden Chromatinstruktur.

Zu 1.: Die Kinetik des "hochaffinen" Thymidintransports wird durch Zusammensetzung und Fluidität der Membranlipide

beeinflusst (114). Die DNS-Synthese ist ihrerseits der bestimmende Faktor für die gesamte Thymidinaufnahme (99). Eine Beeinflussung der Membranfluidität durch Reaktion vorwiegend ungesättigter Fettsäuren mit Peroxiden und Hydroxylradikalen ist nicht grundsätzlich auszuschließen (78,102). Aufgrund von Thymidineinbauuntersuchungen an Zellkulturen konnte allerdings eine Hemmung des Thymidintransports als Ursache für den verminderten Einbau dieser DNS-Vorstufe in säurefällbares Zellmaterial 2,5 - 4 h nach Bestrahlung mit Dosen bis zu 10 Gy (54,66,71) ausgeschlossen werden. 50 Gy beeinträchtigten bereits 10 min später das Carriertransportsystem, ohne die erleichterte Diffusion zu beeinflussen (54,66). Demgegenüber wurde die Phosphorylierung von dT zu Thymidinmonophosphat(dTMP) über eine dosisunabhängige (0,01-1 Gy) Thymidinkinase-Hemmung 2-6 Stunden nach Bestrahlung um maximal 35 % gesenkt (35,36,71).

Folgerung 1: Der dT-Transport beeinflusst unmittelbar nach Strahlenexposition in dem o.g. Dosisbereich die Markierung der DNS nicht. Demgegenüber ist ein vermindelter ³H-dT-Einbau in die DNS 2 - 6 Stunden nach Bestrahlung aufgrund mangelnder Phosphorylierung von ³H-dT zu ³H-dTMP (und höheren Phosphorylierungsstufen) anzunehmen.

Zu 2.: Generell führen Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)-Pool-Ungleichgewichte zu einer Hemmung der DNS-Synthese (103,siehe Einleitung). 1 h nach in vivo-Bestrahlung von Ratten mit 3-8 Gy z.B. waren die Vorstufen-Pools in Knochenmarkszellen gering expandiert; 6 h später ergab sich eine dosisabhängige Verkleinerung um 20-50 %, und nach 2-3

Tagen waren die Poolgrößen um 50-80 % verringert (5) . Die dTTP-, dATP- und die dGTP-Pools in Zellen des Chinesischen Hamsters waren 1 h nach in vitro Bestrahlung mit 8-32 Gy (ebenso wie der Anteil ihrer radioaktiv-markierten Vorstufen) nahezu unverändert (116).

Eigene Untersuchungen zeigten -nach Auffüllung des dTTP-Pools mit kaltem Thymidin -keine Beeinflussung der strahleninduzierten DNS-Synthese-Hemmung bei 4 Gy in vivo- und 64 Gy in vitro-Bestrahlung (Abb.:4.5.1.4, 4.4.2). Zu vergleichbaren Ergebnissen führte die in vitro-Exposition von menschlichen Lymphozyten mit 4 Gy (1). Unmittelbar nach einer in vivo-Akutbestrahlung mit 8 Gy konnte dagegen ein Anstieg des O_2 -Verbrauchs und ein rascher Abfall von ATP, NADPH sowie der an der Glykolyse beteiligten Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glc6PDH) in Knochenmarkszellen ermittelt werden (5,6).

Folgerung 2: Der dNTP-Pool wird zeitabhängig durch die o.g.Dosen beeinflusst ,wobei Auswirkungen auf die DNS-Synthese bereits nach 2 h nicht unwahrscheinlich sind. Dabei spielen möglicherweise dNTP-Bildungsstörungen durch Energiemangel eine wichtige Rolle.

Zu 3.: Die Frage einer Inaktivierung von Enzymen durch ionisierende Strahlung im Zellmilieu wurde u.a. von STREFFER und ALTMAN et al.(5,6) umfassend behandelt. Hinsichtlich des Inaktivierungsmechanismus spielen u.a. Konformationsänderungen aktiver Zentren durch Interaktion mit freien Radikalen eine große Rolle. Die Strahlensensibilität eines Enzyms wird u.a. durch seine Größe, sein Milieu sowie Anzahl und Art der sie enthaltenden Aminosäuren bestimmt und nimmt mit steigendem

Anteil SH-haltiger Aminosäuren zu (5,98).

Strahlendosen im Bereich von 1-36 Gy in vitro konnten die Aktivität der an der DNS-Synthese und -Reparatur beteiligten Polymerasen I und II in den ersten Stunden nach Bestrahlung nur geringfügig beeinträchtigen (1).

Demgegenüber wird die Nukleinsäure- und Proteinsynthese schon nach 2 Gy über mehrere Tage gehemmt (5,6).

Folgerung 3: Die Strahlenempfindlichkeit der Enzyme schwankt erheblich, ist jedoch im allgemeinen um Größenordnungen geringer als ihre Neubildung, die von einer guten Energieversorgung sowie von einer intakten Transkriptions- und Translationsfähigkeit der Zelle abhängig ist (58).

Zu 4.: Die im unteren Dosisbereich (5 Gy) erzeugten Einzelstrangbrüche scheinen v.a. für die jüngst von PAINTER (86) wieder herausgestellte Replikon-Initiations-Hemmung verantwortlich zu sein (31). Mit zunehmender Dosis (ca. 50 Gy) steigt die Zahl der Doppelstrangbrüche (86), wodurch auch die Kettenverlängerung bereits initiiierter Replikationsabschnitte verhindert wird (31). Dabei scheint ein noch nicht identifizierter - in den strahlenresistenten A-T-Zellen fehlender-Faktor eine Schlüsselrolle zu spielen (86). Bei diesem Faktor handelt es sich möglicherweise um ein Zellzyklus-regulierendes Protein, bekannt als "PCNA/Cyclin" (proliferating cell nuclear antigen) (PRELICH, '87). Dieser in der S-Phase ansteigende Faktor stimuliert die Polymerase III (Elongation) und fällt offenbar erst nach Replikation des für ihn kodierenden Gens ab (127). Somit scheint neben der Reparatur von Strang-

brüchen (96,111) auch die Intaktheit eines solchen Gens für die weitere Replikations- und Mitosefähigkeit der Zelle notwendig zu sein. Die Zugänglichkeit der DNS für Reparaturenzyme ist ihrerseits von der Intaktheit der Chromatinstruktur abhängig (31,107 u.a.), deren Histone F1 und F3 (viele SH-Gruppen enthaltend) relativ strahlensensibel sind (85). Dabei könnte die Poly-ADP-Ribosylierung, die gleichzeitig die Ligase-Reaktion unterstützen soll (44,106), zur Stabilisierung und kontrollierten Relaxation der Chromatinstruktur beitragen (17,107).

Folgerung 4:

Die durch eine bestimmte Dosis erzeugte DNS-Synthese-Hemmung wird primär durch Schäden an der DNS selbst verursacht (72,86). Der Grad der DNS-Schädigung hängt jedoch von zahlreichen Faktoren, v.a. aber auch von der Aktivität und Synthese solcher Enzyme ab, welche Radikale des Wassers, wie $\text{OH}^\bullet$, $\text{H}^\bullet$, $\text{O}_2^\bullet$, $\text{HO}_2^\bullet$, abfangen bzw. inaktivieren. Genannt seien Superoxid-Dismutase (SOD) und Glutathion-Reduktase (GR)) (126). Ein weiterer wesentlicher Faktor mit Einfluß auf den Grad der DNS-Schädigung ist offensichtlich die Chromatinstruktur (41,96,128). Die Dauer der DNS-Synthese-Hemmung wird schließlich durch die Wirksamkeit der Reparatursysteme bestimmt (30,125 u.v.a.), die ihrerseits u.a. von unter den Punkten 1-4 aufgeführten Faktoren abhängig ist.

5.2. Beeinflussung der DNS-Synthese-Hemmung durch fraktionierte Vorbestrahlung

5.2.1. Eigene Untersuchungen

Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit durchgeführten Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Durch fraktionierte Vorbestrahlung der Ratten mit $4 \times 0,012$ Gy konnte eine 3 bis 4 Tage später akut-strahleninduzierte semikonservative ³H-dT-Einbau-Hemmung in die DNS signifikant ($p < 0,05$) um 17 % verringert werden.
2. Dieser Effekt war durch vorherige Zugabe kalten Thymidins aufhebbar und zeigte sich nicht am 1. und 5. Tag nach der letzten Fraktion.
3. Durch alleinige fraktionierte Bestrahlung der Ratten mit $4 \times 0,012$ Gy konnte der semikonservative ³H-dT-Einbau in die DNS 3 Tage nach der letzten Fraktion um 40 % erhöht werden.
4. Dieser Effekt zeigte sich nicht nach einer fraktionierten Bestrahlung mit $4 \times 0,1$ Gy und war nicht durch kaltes Thymidin aufhebbar.

5.2.2. Adaptiver Effekt als mögliche Ursache einer Änderung der Strahlenreaktion

5.2.2.1. Verkleinerter dTTP-Pool?

Da die Stimulierung des ³H-dT-Einbaus durch niedrig dosierte fraktionierte Bestrahlung ca. 1,5 h nach hochdosierter Akutbestrahlung durch Auffüllung des Thymidinpools mit kaltem dT

aufzuheben war, deutet alles auf eine gegenüber den fraktioniert-scheinbestrahlten Kontrollen (K) relative Entleerung des endogenen Thymidinpools bei den fraktioniert vorbestrahlten Tieren (F) hin. Als Ursache für die unterschiedlichen Thymidinpool-Größen von K und F kommen vor allem 2 Möglichkeiten in Betracht:

1. Die Verwertung von H-dT³ über die Thymidinkinase(TK)-vermittelte Phosphorylierung der extern zugeführten DNS-Vorstufe zu dTMP -und/oder die de novo-Synthese von dTMP in F gegenüber K wurden gestört.
2. Der Verbrauch an dTTP war in F gegenüber K -aufgrund einer bei F später einsetzenden Hemmung der DNS-Synthese erhöht.

Die erstere Möglichkeit ist insofern weniger wahrscheinlich, als eine strahleninduzierte TK-Hemmung v.a. im Kleinstdosissbereich reversibel ist (71), d.h. , als die TK-Aktivität in Knochenmarkszellen nach einer Bestrahlung von 0,01-1 Gy schon 10 h später wieder Kontrollwerte erreicht (35,36,71);

der dTTP-Pool somit -neben einer bei Dosen von 0,012 Gy /Tag als unbeeinflusst anzunehmenden dTMP-de novo-Synthese (5)-rechtzeitig bis zu der 3 Tage später erfolgenden hochdosierten Akutbestrahlung in F wieder aufgefüllt sein muß.

Trifft die somit wahrscheinlichere zweite Möglichkeit zu, nach der der in F gegenüber K verkleinerte Pool die Folge einer länger andauernden "Sogwirkung" der DNS-Synthese (99) auf den dTTP-Vorstufen-Pool aufgrund einer in F etwas später einsetzenden akut-strahleninduzierten H-dT³-Einbau-Hemmung ist, sollte schließlich die völlige Hemmung der semikonservativen DNS-Synthese bei K und F die Abschwächung der durch akute hochdosierte Strahlenexposition bedingten

DNS-Synthese-Hemmung nach fraktionierter Vorbestrahlung zum Verschwinden bringen (115). Und eben dies war nach Hemmung der DNS-Polymerase I durch ara-C der Fall (Abb.4.5.3.4.2.). Diese Möglichkeit setzt jedoch die Annahme einer begrenzten Kapazität des dTTP-Vorstufenpools voraus. Eine solche Limitierung der dTTP-Verfügbarkeit ist 2 h nach Einwirkung einer Akutbestrahlung mit subletalen- oder letalen Strahlendosen (4 Gy) anzunehmen (5,6), da zu diesem Zeitpunkt in F und K die TK-Aktivität bereits deutlich (um ca 20 %) vermindert ist (71) und die Zellen nach Aufarbeitung der Ratten (1 h nach der Akutbestrahlung) ihren dTTP-Pool nur noch über extern³ zugeführtes H-dT und über de novo-synthetisiertes dTMP auffüllen können.

Auch die Nichtaufhebbarkeit des Effektes durch Auffüllung des dTTP-Pools mit kaltem dT 3 Tage nach alleiniger fraktionierter Bestrahlung mit 4x0,012 Gy (Abb.4.5.2.) läßt vermuten, daß die Akutbestrahlung unter den genannten Bedingungen die Ursache für den dT-Vorstufenengpaß in F -unter der Voraussetzung einer Sogwirkung durch eine in F später einsetzende DNS-Synthese-Hemmung -sein könnte.

Für den dT-Vorstufenengpaß könnte neben der genannten TK-Hemmung (35,36,71) eine 2 h nach der Akutbestrahlung einsetzende Verzögerung der de novo-Synthese von dTMP aufgrund einer "Energieverknappung" (ATP und NADPH-Verluste) verantwortlich sein (5,6), da beispielsweise der ATP-Gehalt in Thymuszellen bereits 1 h nach einer Dosis von 4 Gy in vivo um 40 % vermindert ist (126).

Als nächstes muß die Frage geklärt werden, wie es zu der in F postulierten "Sogwirkung" der DNS-Synthese auf den dTTP-

Vorstufenpool gekommen sein könnte.

5.2.2.2. Der adaptive Effekt

Unter "adaptivem Effekt" versteht man die Resistenz-Erhö-
hung gegen letale oder mutagene Wirkungen schädigender Agen-
tien durch eine vorangegangene Behandlung mit diesen Noxen
in kleinen Dosen (111) (vergleichbar mit dem
Begriff "Hormesis").

In jüngster Zeit konnte der Wissensstand über mögliche adap-
tive Effekte nach Einwirkung stark protrahierter- oder frak-
tionierter Bestrahlung u.a. durch Arbeiten von WIENCKE
(121), SANDERSON u. MORLEY (93), TUSCHL et al. (109-111),
KLEIN et al. (60) , OLIVIERI et al. (84) und CROUTE et
al. (23,24) an tierischen und menschlichen Lymphocyten sowie
Fibroblasten stark erweitert werden.

Auf die DNS-Synthese übertragen, lassen adaptive Mechanismen
u.a. erwarten, daß entweder die semikonservative DNS-Synthese
a priori innerhalb gewisser Grenzen vor ionisierender Strah-
lung geschützt (SDS) (u.a. 23,84) und/oder eine bereits erfolgte
Hemmung der SDS durch beschleunigte DNS-Reparatur (UDS) ver-
kürzt wird (u.a. 121).

A: Semikonservative DNS-Synthese (SDS)

Schon BIEBL (10) entdeckte 1961 chemische Strahlenschutzstof-
fe im Protoplasma der Pflanze, die - während der Bestrahlung
entstehende - Ionisationsprodukte des Wassers abfangen und
unschädlich machen. CONTER u. PLANEL (22) sowie CROUTE et
al. (23) konnten nachweisen, daß kleinste γ -Strahlendosen (53
mGy/Jahr) Ionisationsprodukte erzeugen und diese tatsächlich

für den in *Synechococcus lividus* beobachteten adaptiven Effekt verantwortlich sind (nach Inkubation unbestrahlter Zellen in bestrahltem Medium zeigten diese gleichfalls eine stimulierte Proliferation). Gleichzeitig konnte eine Erhöhung der Radikale inaktivierenden bzw. Peroxyde bindenden Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion-Reduktase (GR) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glc6PDH) festgestellt werden (19-21). OLIVIERI et al. (84) zeigten 1984 anhand protrahiert vorbestrahlter menschlicher Lymphocyten ($0,01-0,1$ $\mu\text{Ci } ^3\text{H-dT} = 3,7-37 \text{ kBq}$), daß eine 3 Tage später erfolgte Akutbestrahlung mit 1,5 Gy weniger Chromosomenaberrationen (SCE's) induzierte als in nichtvorbestrahlten Lymphocyten. Aus der Tatsache, daß nach Meinung der meisten Autoren eine Hemmung der SDS v.a. über eine Replikon-Initiations-Hemmung (bis 5 Gy) als Folge strahleninduzierter DNS-Strangbrüche zustande kommt (31,80,84,86) und die Anzahl der zu Chromosomenaberrationen führenden Strangbrüche (111) in vorbestrahlten adaptierten Zellen jedoch deutlich geringer ist (80,84, 110,111 u.a.), läßt den Schluß zu, daß die in 4.5.3.3. beschriebene Verminderung der SDS-Hemmung in Knochenmarkszellen vorbestrahlter Ratten als Folge einer adaptiven Induktion o.a. Enzyme anzusehen ist. Diese wären in der Lage, eine akut-strahleninduzierte DNS-Synthese-Hemmung durch Eliminierung von Radikalen abzuschwächen. Da dieser Effekt nur am 3. und 4. Tag nach der letzten Fraktion zu ermitteln war (Abb. 4.5.3.3. II), dürften folglich diese Enzyme nur um diese Zeit erhöht sein, was von CROUTE et al. (24) 1986 nach Enzymmessungen in protrahiert-vorbestrahlten menschlichen Lymphocyten für GR und Glc-6PDH bestätigt werden konnte; ihre

Aktivitäten waren nur am 3. und 4. Tag (um ca. 25 % gegenüber den Nichtvorbestrahlten) erhöht (24). Eine in F gegenüber K erhöhte GR-Aktivität würde auch den in F durch Energiemangel postulierten dTMP-Vorstufenengpaß erklären. GR bildet Glutathion (GSH), welches über Glutathion-Peroxidase unter NADPH-Verbrauch mittels Oxidation (GSSG) strahleninduzierte Peroxyde und Radikale abfängt (58). Da Glc6PDH nur im begrenzten Umfang NADPH nachliefert (58), kann dies zu einer raschen NADPH-Verknappung in der Zelle führen (23,24,126).

B:Unprogrammierte (reparaturbedingte) DNS-Synthese (UDS)

Die Beteiligung eines adaptiven Effekts im Sinne einer strahleninduzierten Induktion von Reparaturmechanismen ist für Säugetierzellen nach wie vor umstritten (47,48,62,68,91), auch wenn der adaptive Effekt von mehreren Autoren u.a. in stark protrahiert-vorbestrahlten menschlichen Lymphocyten bereits nachgewiesen worden ist (60,93,110,121). Hierbei konnte v.a. ein Anstieg der Poly(ADP-Ribose)-Synthese -einem wichtigen Co-Faktor der Reparatursynthese (16,38,105,110 u.a.) -beobachtet werden (60,105,110,121). Eine Induktion der DNS-Basenschäden-reparierenden ⁶0-Methylguanin-DNS Methyltransferase durch ionisierende Strahlen in Säugerzellen wird diskutiert (38,122). Eigene Untersuchungen konnten zur Klärung dieses Problems nichts beitragen (Abb.4.5.3.3.), da eine Stimulation der UDS fraktioniert-vorbestrahlter Ratten nach einer in vivo-Akutbestrahlung nur andeutungsweise (1- und 3 Tage-Werte) zu erkennen war. Auch war das Ergebnis weder durch Enzymhemmstoffe (Novobiocin, Nalidixinsäure,

Abb.:4.5.3.4.3. und 4.5.3.4.4.) noch durch UV-Bestrahlung (Abb.4.5.3.2.) beeinflussbar.

Dabei sollte jedoch nicht unerwähnt bleiben, daß jüngst bekanntgewordene, über die Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase (RNR) hinausgehende Einflüsse von Hydroxyharnstoff (HU) auf den DNS-Metabolismus (wie Behinderung der Polymerase- und Ligasetätigkeit) zumindest die quantitative Erfassbarkeit der zellulären Reparaturvorgänge über den H-dT-Einbau ³ in Gegenwart von HU infrage stellen (99, dort weitere Literaturstellen).

Eine fraktioniert-strahleninduzierte Erhöhung der Reparaturkapazität 7,5 min nach einer Akutbestrahlung in vitro (6,4 Gy) konnte auch über die Nukleoidsedimentation ausgeschlossen werden (Abb.4.6.3.).

5.2.2.3. Dosimetrische Einordnung des Effekts

Eine Strahlendosis von 0,01 Gy verursacht etwa 9 Strahleneinfangereignisse pro Zellkern ($\varnothing$ 8 μ m), die ihrerseits ca. 60 Ionisationsereignisse einschließlich Sekundärionisationen erzeugen (33,34). Diese induzieren ca. 3-5 SSB's und 0,15 DSB's (5). Eine solche Strahlendosis ist das 5- bis 10-fache der durch die Umgebungsstrahlung verursachten mittleren Jahresdosis (71). Offensichtlich ist ein adaptiver Strahleneffekt (-Hormesis) nur in einem Dosisbereich zu erzielen, der knapp über dem der ambienten Strahlung liegt (73-76,118,119). Die eigenen Untersuchungen, nach denen ein deutlicher strahleninduzierter Effekt mit 4 x 0,012 Gy am 3. Tag erzielt, dieser jedoch für 4 x 0,1 Gy weder am 1. und 3. noch am 5. Tag ermittelt werden konnte, scheinen dies zu bestätigen

(4.5.2.,S.68). Eine Art "Schwellendosis" zur Auslösung dieses Strahleneffekts konnte jedoch bislang durch Messungen in diesem Dosisbereich wegen hoher statistischer Schwankungen weder bewiesen noch widerlegt werden (71, Abb.4.5.1.3).

Offenbar tritt jedoch der Effekt nach sehr kleinen fraktionierten Strahlendosen ($4 \times 0,0014$ Gy) früher ein (Tabelle 2, S.71). Inwieweit die Höhe der Akutbestrahlung den fraktionierte-strahleninduzierten Effekt zu beeinflussen vermag, muß unbeantwortet bleiben (Tabelle 2). Man kann sich jedoch vorstellen, daß besonders hohe Dosen, wie beispielsweise 64 Gy (4.5.3.3.,S.78), wegen ihrer zellschädigenden Wirkungen (5,6) o.g. Effekt zunichte machen.

5.3. Schlußfolgerungen und Ausblick

Durch fraktionierte Ganzkörper-Röntgenbestrahlung von $4 \times 0,012$ Gy konnte die semikonservative DNS-Synthese am 3. Tag nach der letzten Fraktion in den Knochenmarkszellen der Ratte stimuliert werden. Erhielten die Ratten am 3. oder 4. Tag nach der letzten Fraktion zusätzlich eine Akutbestrahlung von 4 Gy, so äußerte sich dieser Effekt in einer gegenüber den nicht fraktioniert-vorbestrahlten Ratten gering^ggradig verminderten DNS-Synthese-Hemmung (vergleiche Abb..4.5.1.1. mit Abb.4.5.3.3. III). Insbesondere wird deutlich, daß diese "Erhöhung der Strahlenresistenz" die bei einer Dosis von 4 Gy grundsätzlich gegebene starke Strahlenschädigung der Knochenmarkszellen (36,57,120) nur gering^ggradig und somit vermutlich nur zeitabhängig (36) abzumildern vermag.

Daß der Effekt (gemessen über den semikonservativen ³H-dT-Einbau) nicht nur die Folge eines -2 h nach Akutbestrahlung-

verkleinerten Thymidinpools ist (Abb.4.5.3.4.1.), zeigt die Aufhebbarkeit der Reaktion durch den Polymerase I-Hemmstoff ara-C (Abb.4.5.3.4.2.). Der adaptive Effekt scheint vielmehr durch einen akut-strahleninduzierten "Vorstufenengpaß" in den fraktioniert-vorbestrahlten Ratten über die gegenüber den "nicht-konditionierten" Kontrollen noch etwas länger anhaltende "Sogwirkung" der SDS auf den Vorstufen-Pool zu entstehen (vergleiche dazu Abb.4.5.2. mit 4.5.3.4.1.).

Als mögliche Erklärung (5.2.2.1.) für die geringgradig erhöhte "Strahlenresistenz" der DNS-Synthese der Knochenmarkszellen fraktioniert-vorbestrahlter Ratten wäre an eine (etwa 3 Tage später wirksam werdende- und bis zum 4. Tag andauernde) Induktion von Enzymen zu denken, die in der Lage sind, strahlenbedingte Radikale und Peroxyde zu eliminieren, bevor diese die DNS-Synthese durch Schädigung und Blockierung der Initiation von DNS-Replikationsabschnitten hemmen.

Inwieweit extrazelluläre Faktoren (z.B. der Hormonhaushalt) (87,94) in diesen Mechanismus eingreifen, ist noch weitgehend ungeklärt (108).

Für die Beteiligung eines adaptiven Effekts im Sinne einer strahleninduzierten Reparaturenzym-Induktion geben die eigenen Untersuchungen jedoch kaum Anhaltspunkte (Abb.4.5.3.2., 4.5.3.3., 4.5.3.4.3. und 4.5.3.4.4. sowie Nukleoidsedimentation Abb.4.6.3.).

Zur weiteren Aufklärung des adaptiven Effektes bieten sich u.a. folgende Analysen an:

1. Direkte Messung der Polymerase I-Aktivität der Knochenmarkszellen 1-5 Tage nach fraktionierter Bestrahlung ($4 \times 0,012$ Gy) .
2. Direkte Messung der Enzymaktivitäten von Superoxid-Dis-mutase (SOD), Glutathion-Reduktase (GR), Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glc6PDH) und Glutathion (GSH) 1-5 Tage nach fraktionierter Bestrahlung ($4 \times 0,012$ Gy).
3. Erfassung der Strahlenschäden der DNS und der DNS-Repa-raturkapazität unter den o.a. Bedingungen mit zusätz-lichen Methoden (insbesondere der Methode der alkalischen Elution).
4. Ausdehnung der vorliegenden Versuche auf andere Zellspezies und Expositionsbedingungen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Nach Röntgenbestrahlung von Knochenmarkszellen *in vitro* und *in vivo* wurde das Verhalten der Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Synthese über den Einbau der DNS-Vorstufe H-dT^3 in die säurefällbare Zellfraktion untersucht. Im Vordergrund der Analysen stand die Frage eines möglichen Einflusses niedrig-dosierter fraktionierter Ganzkörperstrahlungsbestrahlung (GKB) auf die Hemmung der DNS-Synthese durch akute hochdosierte Strahlenexposition. Nucleoidsedimentation, Isotopenverdünnungsanalyse und Hemmstoffversuche sollten Aufschluß über den möglichen Wirkungsmechanismus nachgewiesener Strahleneffekte geben. Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Durch akute Ganzkörperstrahlungsbestrahlung mit Dosen $\geq 0,5$ Gy wurde der semikonservative H-dT^3 -Einbau in die DNS signifikant und dosisabhängig biphasisch gehemmt ($p < 0,05$).
2. Ganzkörperstrahlungsbestrahlung mit einer Dosis von 4 Gy hatte eine rund 60 %ige Hemmung des semikonservativen H-dT^3 -Einbaus in die DNS zur Folge. Die H-dT^3 -Einbau-Hemmung konnte durch fraktionierte Vorbestrahlung der Ratten mit $4 \times 0,012$ Gy am 3.-4. Tage nach der letzten Fraktion signifikant ($p < 0,05$) um 17 % verringert werden. Dieser Effekt war am 1. und 5. Tag nach der letzten

Fraktion noch nicht bzw. nicht mehr feststellbar und durch vorherige Gabe von kaltem Thymidin (dT) und/oder durch den Polymerase I-Hemmstoff 1- β -D-Arabinofuranosyl-Cytosin (ara-C) aufzuheben.

3. Alleinige fraktionierte Vorbestrahlung der Ratten mit $4 \times 0,012$ Gy erhöhte den semikonservativen ³H-dT-Einbau in die DNS am 3. Tag nach der letzten Fraktion um 40 % . Dieser Effekt war nicht durch dT aufhebbar.
4. Durch niedrig-dosierte fraktionierte Vorbestrahlung der Ratten waren weder die DNS-Reparatur-Synthese noch die Nucleoidsedimentation signifikant zu beeinflussen.

Den Ergebnissen zufolge kann die verminderte DNS-Synthese-Hemmung fraktioniert vorbestrahlter Ratten nach einer in-vivo Akutbestrahlung über eine Erhöhung der Strahlenresistenz der Knochenmarkszellen am 3. und 4. Tag nach der letzten Fraktion erklärt werden.

SUMMARY

Influence of an acute whole-body X-irradiation on replicative and unscheduled (repair induced) deoxyribonucleic acid synthesis in bone marrow cells of the rat after prior low-level fractionated X-irradiation -
a contribution to radiation hormesis

Deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis was examined following X-irradiation of bone marrow cells in vitro and in vivo by using the incorporation of tritium labeled thymidine (^3H -dT). A possible influence of low-level fractionated whole-body X-irradiation on the inhibition of DNA synthesis caused by high-dosed acute X-ray exposure was investigated.

Sedimentation of bone marrow nucleoids, tracer (^3H -dT) dilution-analyses and experiments using DNA synthesis-inhibiting substances should give an answer about the possible mechanism of the proved radiation effects.

The essential results may be summarized as follows:

1. 1 hour after an acute whole-body X-irradiation with doses of $\geq 0,5$ Gy, replicative ^3H -dT-incorporation into DNA was inhibited significantly ($p < 0,05$) in a dose-dependent manner.
2. Whole-body X-irradiation with a dose of 4 Gy caused an inhibition of replicative ^3H -dT-incorporation in DNA by about 60 % which has been diminished significantly by 17 % ($p < 0,05$) following fractionated preirradiation of

the rats with doses of $4 \times 0,012$ Gy at the 3rd to 4th day after the last fraction.

This effect was not seen at the 1st and 5th day after the last fraction and could be abolished by "cold" thymidine and/or by using the polymerase I-inhibitor 1-D- β -arabino-furanosylcytosine (ara-C).

3. Fractionated irradiation of the rats with $4 \times 0,012$ Gy alone enhanced replicative ³H-dT-incorporation into DNA by about 40 % at the 3rd day following the last fraction. This effect could not be neutralized with "cold" thymidine.
4. Neither unscheduled (repair induced) DNA synthesis nor sedimentation of bone marrow nucleoids could be influenced significantly by low-level fractionated X-irradiation.

The results suggest the conclusion, that diminished inhibition of DNA synthesis in fractionated pre-irradiated rats, caused by an acute X-ray exposure in vivo, is the consequence of increased radioresistance in bone marrow cells at the 3rd and 4th day after the last fraction.

7.Literaturverzeichnis

1. Agarwal, S.S., E. Katz, A. Krishan, L.A. Loeb:
DNA replication in X-irradiated human lymphocytes.
Cancer Res. 41 , 3973 - 3978 (1981)
2. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson:
The molecular biology of the cell.
New York & London, Garland Publ. Inc. 1983
3. Anderson, R., G.M. Troup:
Effects of irradiation upon the response of murine spleen cells to mitogens.
Am.J.Ass. Pathol. 109, 169-187 (1983)
4. Anderson, R.E., G.M. Troup, S. Tokudu, N.L. Warner:
Radiation-induced augmentation of tumor rejection in mice.
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 39, 331 (1980)
5. Altman, K.I., G.B. Gerber, S. Okada:
Radiation Biochemistry Vol. I: Cells
New York & London, Academic Press, pp. 3-331 (1970)
6. Altman, K.I., G.B. Gerber, S. Okada:
Radiation Biochemistry Vol.II: Tissues and body fluids
New York & London, Academic Press, pp. 1-73 (1970)
7. Beer, J.Z., J. Mencl, M.F. Horng, E.L. Gregg, H.H. Evans:
Effects of low dose rate (0,003 - 0,025 Gy) chronic X-irradiation on radioresistant and radiosensitive L5 178Y mouse lymphoma cells.
Int. J. Radiat. Biol. 48, 609 -619 (1985)
8. Bello, L.J.:
Regulation of thymidine kinase synthesis in human cells.
Exp. Cell Res. 89, 263-274 (1974)

9. Bianchi, V., A. Zantedeschi, A.G. Levis:
The scintillometric evaluation of DNA-Repair can be distorted by changes of thymidine pool radioactivity. Chem.-Biol. Interact. 43, 17 - 31 (1983)

10. Biebl, R.:
Wirkung ionisierender Strahlen auf die Pflanze. Naturwiss. Rundschau 14 ,127-132 (1961)

11. Bjursell, G., L. Skoog :
Control of nucleotide pools in mammalian cells. Antibiotics Chemother. 28, 78-85 (1980)

12. Broda, W.:
Die angeblich biopositiven Wirkungen ionisierender Strahlen. Naturwiss. Rundschau 34, 49-58 (1981)

13. Broda, W.:
Biopositive effects of ionizing radiation . Health Phys. 46,702-704 (1984)

14. Bryant, P.E.:
Changes in sensitivity of cells during exposure to radiation at low dose rate. Int. J. Radiat. Biol. 22, 67-73 (1982)

15. Chen,C.Z. ,D.E. Watt :
Biophysical mechanism of radiation damage to mammalian cells by X-and Y-rays. Int. J. Radiat. Biol. 49 ,131-142 (1986)

16. Cleaver, J.E.:
DNA ligation and changes in chromatin structure associated with repair patches under conditions of inhibition of poly(ADP-ribose) synthesis. Carcinogenesis 7 , 971-973 (1986)

17. Coggle,J.E.:
Biological effects of radiation.
London, Taylor & Francis Ltd. 1983

18. Cohen,J.J.:

Natural background as an indicator of radiation induced cancer.
Proc.5.th Int. Congr. Int. Radiat. Protect. Ass.
Jerusalem (1980)

19. Conter, A., D. Dupouy, C. Delteil, H. Planel:

Influence of very low doses of ionizing radiation on *Synechococcus lividus* metabolism during the initial growth phase.
Arch. Microbiol. 144, 286-290 (1986)

20. Conter,A., D. Dupouy, H. Planel:

Effects of dose rate on response of *Synechococcus lividus* to very low doses of chronic Y-radiation. Influence of enzymatic equipment of starting cells.
Radiat. Res.105, 379-386 (1986)

21. Conter,A., D. Dupouy, H. Planel :

Demonstration of a biological effect of natural ionizing radiation.
Int. J. Radiat. Biol. 43 , 421-432 (1983)

22. Conter,A, H. Planel:

Radiobiologie.- Effets biologiques de faibles doses d'irradiation gamma. Mis en evidence d' un effet de l' irradiation du milieu soel sur la croissance d'une cyanobacterie *Synechococcus lividus*.
C.R. Acad. Sc. Paris 303, 101-104 (1986)

23. Croute,F., J.P. Soleilhavoup ,D. Dupouy, S.Vidal, H. Planel :

Paramecium Tetraurelia growth stimulation under low level chronic radiation: Investigation on a possible mechanism.
Radiat. Res.92, 560-567 (1982)

24. Croute,F. , S. Vidal, J.P. Soleilhavoup, C. Vincent, G. Serre, H. Planel:

Effects of a very low dose rate of chronic ionizing radiation on the devision potential of human embryonic lung fibroblasts in vitro.
Exp. Gerontol. 21,1-11 (1986)

25. Davidson , F.R.S.:
The biochemistry of nucleic acids, 8. Aufl.
London, Chapman & Hall 1976

26. Decker, W., W. Degner:
Zum Wirkungsmechanismus kleiner Dosen ionisierender
Strahlung auf pflanzliche Objekte.
Radiobiol. Radiother. 24 , 197-217 (1983)

27. Denekamp, J:
Cell kinetics and radiation biology.
Int. J. Radiat. Biol. 49, 357-380 (1986)

28. Diatloff-Zito, C., C. Turleau, M. Canabis, J. de Grouchy:
Low dose rate ionizing radiation induces increased
growth capacities of D-deletion retinoblastoma skin
fibroblasts.
Carcinogenesis 5, 1305-1310 (1984)

29. Dickerson, R.E.:
Feinstruktur der DNA-Helix
In: Erbsubstanz DNA , pp. 18-33
Spektrum der Wissenschaft: Verständliche Forschung,
Heidelberg , Verlagsges. 1985

30. Downes, C.S.:
Molecular biology of DNA-repair
Mutat. Res. 166, 221-226 (1986)

31. Elkind, M.:
DNA-damage and cell killing , cause and effect.
Cancer 56 , 2351-2363 (1985)

32. Feinendegen, L.E. , V.P. Bond, E.P. Cronkite, W.L. Hughes:
RNA-turnover in normal rat bone marrow
Ann. N.Y. Acad.Sci. 113, 727-741 (1964)

33. Feinendegen, L.E., V.P. Bond, C.A. Sondhaus:
The critical cell concept and its application in the
assessment of effects from different dose rates and
different radiation qualities.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 459 , 211-220 (1986)

34. Feinendegen, L.E., J. Booz, V.P. Bond, C.A. Sondhaus:
Microdosimetric approach to the analysis of cell responses at low dose rate.
Radiat. Prot. Dosimetry 13, 299-306 (1985)
35. Feinendegen, L.E., H. Mühlensiepen, C. Lindberg, J. Marx
W. Porschen, J. Booz:
Acute effect of a very low dose in mouse bone marrow cells: a physiological response to background radiation.
IAEA - SM - 266/27, 459-471 (1984)
36. Feinendegen, L.E., H. Mühlensiepen, C. Lindberg, J. Marx,
W. Porschen, J. Booz:
Acute and temporary inhibition of thymidine kinase in mouse bone marrow cells after low-dose exposure.
Int. J. Radiat. Biol. 45, 205-215 (1984)
37. Fliedner, T.M., W. Nothdurft, W. Calvo:
The development of radiation late effects to the bone marrow after single and chronic exposure.
Int. J. Radiat. Biol. 49, 35-46 (1986)
38. Friedberg, E.C.:
DNA-repair. Biochemistry and molecular biology
New York, Freeman a.Co.Publ., pp. 145-343 (1985)
39. Giaccia, A., R. Weinstein, J. Hu, T.D. Stamato:
Cell cycle dependent repair of doublestrand DNA breaks in a Y-ray-sensitive chinese hamster cell.
Somatic Cell Mol. Genet. 2, 485-491 (1985)
40. Günther, R., H. Altmann:
DNA-Synthese und DNA-Reparatur bei chronischem Rheumatismus unter kleinster Radon-Einwirkung.
Z. Rheumatol. 37, 17-22 (1978)
41. Hagen, U.:
Current aspects on the radiation base damage in DNA.
Radiat. Environm. Biophys. 25, 261-271 (1986)

42. Harbers, E.:
Nukleinsäuren: Biochemie und Funktionen . 2.Aufl.
Stuttgart, Thieme Verlag (1975)
43. Hattori K., N.Koto:
Protective effect of ozon in mice against whole body
X-irradiation.
Nature 198, 1220-1226 (1982)
44. Heartlein, M.W., R.J. Preston:
The effect of 3-aminobenzamid on the frequency of X-ray-
or neutron induced chromosome aberrations in cycling or
noncycling human lymphocytes.
Mutat. Res. 148 , 91-97 (1985)
45. Hellström, I., K.E. Hellström:
Antitumor effect of whole-body X-irradiation. Possible
role of X-ray sensitive T-suppressor cell population.
Transpl. Proc. 11 , 1073-1076 (1979)
46. Henderson, J.F., A.R. Peterson:
Nucleotide metabolism - an introduction
New York & London, Academic Press (1973)
47. Hendry, J.H., F.C. Cowie, K.H. von Wangenheim:
The reversion phenomenon in irradiated fern prothallia.
Effects of acute or chronic anoxia and LET.
Radiat. Environm. Biophys. 24 , 45-56 (1985)
48. Hendry, J.H.:
Radioresistance induced in fern spores by prior irradi-
ation.
Radiat. Res. 106 , 396-400 (1986)
49. Henry, H.F.:
Is all nuclear radiation harmful?
Health Phys. 43 , 767-769 (1982)
50. Herzfeld, A., S.M. Raper:
Relative activities of thymidylate synthetase and thymidine
kinase in rat tissues.
Cancer Res. 40, 744-750 (1980)

51. Hickey, R.C., E.J. Bowers, D.E. Spence, B.S. Zemel, A.B. Clelland, R.C. Clelland:

Low level ionizing radiation and human mortality:
Multi- regional epidemiological studies.
Health Phys. 40 , 625-641 (1981)
52. Hickey, R.C., E.J. Bowers, R.C. Clelland:

Radiation hormesis due to stimulatory effects on physical functions.
Health Phys. 44 , 207-219 (1983)
53. High background radiation group:

Health survey in high-background radiation areas in China.
J. Radiat. Res. 22, 88-100 (1981)
54. Hopwood, L.E., W.C. Dewey:

Effect of X-irradiation on the transport of thymidine into asynchronous and S-phase CHO cells.
Int. J. Radiat. Biol. 29, 279-286 (1976)
55. Howard, A., F.G. Cowie:

Induced resistance in Clostridium: Indirect evidence for the induction of repair enzymes.
Radiat. Res. 75, 607-616 (1978)
56. Jeggo, P.A., K. Kemp:

X-ray sensitive mutants of chinese hamster ovary cell line : radiosensitivity of DNA synthesis.
Mutat. Res. 145, 171-176 (1985)
57. Jensh, R.P.:

Studies concerning the effects of low level prenatal X-irradiation on postnatal growth and adult behavior in the Wistar rat.
Int. J. Radiat. Biol. 50 , 1069-1081 (1986)
58. Karlson, P.:

Biochemie, 12. Auflage,
Stuttgart, Thieme Verlag , pp.104-132 (1984)

59. Kirillova, T.V., K.L. Manukyan:
Template properties and repair of a newly synthesized DNA in UV-sensitive clones in the chinese hamster after UV-irradiation.
Stud. Biophys. 113, 127-134 (1986)
60. Klein, W., F. Kocsis, A. Topaloglou:
DNA-Metabolismus und Poly-(ADP)-Ribose-Synthese bei beruflich strahlenexponierten Personen.
OEFZS Ber. No.4307 , 496 (1985)
61. Kornberg, R.D., A. Klug :
Das Nukleosom .
In: Erbsubstanz DNA , pp. 46-61
Spektrum der Wissenschaft: Verständliche Forschung, Heidelberg, Verlagsges. 1985
62. Koval, T.M.:
Inducible repair of ionizing radiation damage in higher eucaryotic cells.
Mutat. Res. 173 , 291-293 (1986)
63. Koval, T.M.:
Intrinsic resistance to lethal effects of X-irradiation in insect and mammalian cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 , 4752-4755 (1983)
64. Koval, T.M.
Multiphasic survival response of a radioresistant lepidopteran insect cell line.
Radiat. Res. 98, 642-648 (1984)
65. Kuzin, A.M., L.V. Slozhenika, L.A. Fialkovskaya, V.M. Primak-Mirolyubor:
Possible influence of natural radiation background on the development of mammals.
Health Phys. 43, 767-769 (1981)
66. Kwok., C.S. , I.V. Chapman:
The effects of X-irradiation on thymidine-transport kinetics and DNA-synthesis in Ehrlich ascites tumor cells in relation to extracellular thymidine concentration
Int. J. Radiat. Biol. 32, 409-429 (1977)

67. Laskowski, W.:
Biologische Strahlenschäden und ihre Reparatur
Berlin, de Gruyter Verlag 1981
68. Laskowski, W.:
Biologische Strahlenschäden und ihre Reparatur ,
pp. 169-182 in:
Die Hypothesen im Strahlenschutz.
-W. Leppin, J. Meißner, W. Wörner, O. Messerschmidt (Hrsg.)
Stuttgart, New York: Thieme Verlag 1985
69. Leonard, A., M. Delpoux, R. Meyer, G. Decat,
E.D. Leonard:
Effects of an enhanced natural radioactivity on
mammalian fertility.
Sc. Total Environm. 45 , 535-542 (1985)
70. Licastro, F., R.L. Walford:
Proliferative potential and DNA repair in lymphocytes
from short lived and long lived strains of mice;
Relation of aging.
Mech. Ag. Dev. 31, 171-186 (1985)
71. Lindberg, C.:
Der Einfluß sehr kleiner Strahlendosen auf den Thymidin-
metabolismus in Knochenmarkszellen bei NMRI-Mäusen.
Kernforschungsanlage Jülich GmbH
Forschungsbericht:ISSN 0366-0885 , Nr. 1964 (1984)
72. Lönn, U.:
X-irradiation affects all DNA replication intermediates
when inhibitiong replicon initiation.
Int. J. Radiat. Biol. 42 , 667-671 (1982)
73. Luckey, T.D.
Hormesis with Ionizing Radiation.
Boca-Ration, CRC-Press 1981
74. Luckey, T.D.:
Physical benefits from low level ionizing radiation.
Health Phys. 43, 771-789 (1982)

75. Luckey, T.D.:
Beneficial physiologic effects of ionizing radiation.
pp. 184-196 in:
Die Hypothesen im Strahlenschutz.
-W. Leppin, J. Meißner, W. Wörner, O. Messerschmidt (Hrsg.)
Stuttgart, New York: Thieme Verlag 1985
76. Luckey, T.D.:
Ionizing radiation promotes protozoan reproduction.
Radiat. Res. 108, 215-221 (1986)
77. Midander, J., K. Revesz:
The frequency of micronuclei as a measure of cell cycle
in irradiated cell populations.
Int. J. Radiat. Biol. 38, 239-242 (1980)
78. Mooibroek, J., W.B. Tieling, A.W.T. Konings:
Comparison of the radiosensitivity of unsaturated fatty
acids, structured as micells of liposomes, under
different experimental conditions.
Int. J. Radiat. Biol. 42, 601-609 (1982)
79. Moquet, J.E., D.C. Lloyd, J.S. Prosser, A.A. Edwards:
Sister-chromatid exchanges induced by mitomycin C after
exposure of human lymphocytes in Go to a low dose
of X-irradiation.
Mutat. Res. 176, 143-146 (1987)
80. Morgan, W.F., P.E. Crossen:
X-irradiation and sister-chromatid exchanges in cultured
human lymphocytes.
Environm. Mutagen. 2, 149-155 (1980)
81. Müller-Bruder, A.:
Untersuchungen über die Wirkung einer ⁶⁰Co-Bestrahlung
auf das Schlupfergebnis von Hühnereiern.
Diss. med. vet. Hannover 1981
82. Narang, S.A.:
DNS-Synthesis,
Tetrahedron 39, 3-22 (1983).

83. Noguchi, K., M. Shimizu, I. Anzai:

Correlation between natural radiation exposure and cancer mortality in Japan I.
J. Radiat. Res. 7, 181-212 (1986)

84. Olivieri, G., J. Bodycote, S. Wolff:

Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine.
Science 223 , 594-597 (1984)

85. Ord, M.G., L.A. Stocken:

Effects of ionizing radiation on the phosphorylation and oxido-reductase state of thiol-groups of histones and their biochemical significance.
Int. Atom. Energy Agency, Vienna 11-12 (1969)

86. Painter, R.B.:

Inhibition of mammalian cell DNA synthesis by ionising radiation.
Int. J. Radiat. Biol. 49 , 771-781 (1986)

87. Patt, H.M., M.N. Swift, E.B. Tyree, E.S. John:

Adrenal response to total body-X-irradiation.
Am. J. Physiol. 150 , 480-487 (1947)

88. Plagemann, P.G.W., R. Marx, R.M. Wohlhueter:

Transport and metabolism of thymidine and 1- β -D-arabino-furanosylcytosine into cultered Novikoff rat hepatoma cells. Relationship to phosphorylation and regulation of triphosphate synthesis.
Cancer Res. 38, 978-989 (1978)

89. Rosenstein, B., S. Barry:

The use of metabolic inhibitors to compare the excision repair of pyrimidine dimers and non-dimer damages in human skin fibroblasts .
Environm. Mutagen. 8, 335-343 (1986)

90. Rubini, J.M., S. Keller, M.S. McCall:

Inhibition of tritiated thymidine incorporation into DNA by alkaline phosphatase preparations.
Cancer Res. 24, 655-661 (1964)

91. Ruby, S.W., J.W. Szastak:
Specific *Saccharomyces Cerivisiae* genes are expressed in response to DNA-damaging agents.
Mol. Cell. Biol. 5 , 75-84 (1985)
92. Russel, G.R., E.J. Partick:
Effects of variations in nucleoside pool sizes on comparison of the incorporation of ³H thymidine into isolated rat liver cells.
Cancer Res. 40 , 3717-3722 (1982)
93. Sanderson, B.J.S., A.A. Morley:
Exposure of human lymphocytes to ionizing radiation reduces mutagenesis by subsequent ionizing radiation.
Mutat. Res. 164 , 374-351 (1986)
94. Sartin, J., M. Chandhuri, M. Obenrader, R.C. Adelman:
The role of hormones in changing adaptive mechanisms during aging.
Fed. Proc. 39 , 3162-3167 (1980)
95. Van der Schans, G.P., H.B. Centen, P.H.M. Lohman:
DNA-lesions induced by ionizing radiation.
Progr. Mutat. Res. 4 , 285-299 (1982)
96. Schneiderman, M.H., K.G. Hofer:
The target of radiation induced division delay.
Radiat. Res. 84 , 462-476 (1980)
97. Shishir, K.:
Rapid changes in desoxyribonucleoside triphosphate pools in mammalian cells treated with mutagens.
Biophys. Res. Comm. 114 , 142-164 (1983)
98. Simone, G., M. Tamba, M. Quintiliani:
Role of glutathione in affecting the radiosensitivity of molecular and cellular systems.
Radiat. Environm. Biophys. 22 , 215-223 (1983)

99. Spath, A.:

Semikonservative und unprogrammierte Desoxyribonukleinsäuresynthese in Thymus- und Knochenmarkszellen der Ratte unter dem Einfluß von Diäthylthiocarbamat (DDC).
Diss. med. vet. München 1985

100. Steinhäusler F., E. Pohl:

Reply to Broda: Biopositive effects of ionizing radiation?
Health Phys. 46, 704-705 (1984)

101. Stubblefield, E., G.C. Müller:

Thymidine kinase activity in synchronized Hela cell cultures.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 20, 535-538 (1965).

102. Szumiel, I.:

Intrinsic radiosensitivity of proliferating mammalian cells.
Adv. Radiat. Biol. 9, 282-321 (1981)

103. Tattersall, M.H.N., K. Ganeshaguru, A.V. Hoffbrand:

dNTP-Pools in human bone marrow and leukaemic cells.
Antibiotics Chemother. 8, 94-101 (1980)

104. Tempel, K.:

Radiologie für Veterinärmediziner.
Stuttgart, Enke Verlag 1983

105. Tempel, K.:

DNA-Reparaturvorgänge in Thymus- und Milzzellen der Ratte in vitro unter dem Einfluß des Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase-Hemmstoffs 3-Aminobenzamid.
Zbl. Vet. Med. A. 32, 123-134 (1985)

106. Tempel, K., I. Schmerold, B. Kläger:

Die Nukleoidsedimentation- eine Methode zum Nachweis von DNA-Schäden und DNA-Reparatur- am Beispiel von Rattenlymphozyten nach Einwirkung physikalischer und chemischer Agentien in vitro.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 98, 3-7 (1985)

107. Tempel K., A.Spath:

Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Synthese von Thymus- und Milzzellen der Ratte in vitro nach Hyperthermie. Strahlenther.: im Druck

108. Totter, J.R.:

Food restriction, ionizing radiation and natural Selection. Mech. Aging Dev. 30, 261-271 (1985)

109. Tuschl, H., H. Altmann, K.Kovac, A. Topaloglou:

Effects of chronic low-dose exposure on DNA repair processes and sister-chromatid exchanges. IAEA - SM - 266/7 , 185-190 (1983)

110. Tuschl, H. , R. Kovac , H. Altmann:

UDS and SCE in lymphocytes of persons occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. Health Phys. 45 , 1-7 (1983)

111. Tuschl, H. , R. Kovac, A. Topaloglou:

Die Wirkung ionisierender Strahlung auf DNA Reparaturvorgänge. pp. 197-205 in:
Die Hypothesen im Strahlenschutz.
-W.Leppin, J.Meißner, W.Wörner, O.Messerschmidt (Hrsg.).
Stuttgart, New York: Thieme Verlag 1985

112. Tyrsted, G.:

Effect of hydroxyurea and 5-fluorodeoxyuridine on desoxyribonucleoside triphosphate pools early in phytohaemagglutinin-stimulated human lymphocytes. Biochem. Pharmacol. 31 , 3107-3113 (1982)

113. Ungemach, F.R., D.Hegner:

Uptake of thymidine into isolated rat hepatocytes; Evidence for two transport systems. Hopple-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359 , 845-856 (1978)

114. Ungemach, F.R.:

Untersuchungen über die Schädigung der Plasmamembran von Hepatocyten nach Lipidperoxidation. Habil.-Schrift München 1983

115. Virsik-Peuckert, R.P., D.Harder:

Kinetics of the effect of ara-C on chromosome aberration yield in irradiated human lymphocytes.
Int.J. Radiat. Biol. 49, 103-108 (1986)

116. Walters, R.A., L.R. Gurley, R.A. Tobey:

Effects of X-irradiation on DNA precursor metabolism and deoxyribonucleoside triphosphate pools in Chinese hamster cells.
Radiat. Res. 60, 173-201 (1974)

117. Wang, J.C.:

DNA - Topoisomerasen
In : Erbsubstanz DNA , pp. 34-45
Spektrum der Wissenschaft: Verständliche Forschung
Heidelberg , wiss.Verlagsges. 1985

118. Wachsmann, F.

Über die Gefährlichkeit ionisierender Strahlung.
Fusion 6 , 1-4 (1986)

119. Wachsmann, F:

Sind kleine Strahlendosen wirklich nur gefährlich?
Neue Zürcher Ztg. 22 (1987)

120. Wangenheim, K.H.V., H.P. Peterson, G.E. Hübner,
L.E. Feinendegen:

Long term radiation effects in the murine haematopoietic stem cell compartment.
Ann. N.Y. Ac. Sc. 459 , 211-220 (1986)

121. Wiencke, J.K., V. Afzal, G. Olivieri, S. Wolff:

³
Evidence that H thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent doses of X-rays involves the induction of a chromosomal repair mechanism.
Mutagenesis 1 , 375-380 (1986)

122. Yarosh, D.B.:

⁶
Review: The role of O-methylguanine-DNA methyltransferase in cell survival mutagenesis and carcinogenesis.
Mutat. Res. 145 , 1-16 (1985)

123. Zufan, T. , W. Luxin:

An epidemiological investigation of mutational diseases
in the high background area of Yangjang, China.
J. Radiat Res. 27 , 141-150 (1986).

Nachtrag:

124. Debieu, D., P.J. Deschavanne, J. Midander, A. Larsson,
E.P. Malaise:

Survival curves of glutathione synthetase deficient
human fibroblasts: correlation between radiosensitivity
in hypoxia and glutathione synthetase activity.
Int. J. Radiat. Biol. 48 , 525-543 (1985)

125. Murray, D., R.E. Meyn:

Differential repair of Y-ray-induced DNA strand breaks
by various cellular subpopulations of mouse jejunal
epithelium and bone marrow in vivo.
Radiat. Res. 109 , 153-164 (1987)

126. Ord, M.G., L.A. Stocken:

The radiosensitivity of rat thymocytes.
Biochem. J. 238 , 517-521 (1986)

127. Prelich, G., M. Kostura, D.R. Marshak, M.B. Mathews,
B. Stillman:

The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear
antigen is required for SV40 DNA replication in vitro.
Nature 326 , 471-475 (1987)

128. Warters, R.L., T. Childers:

Radiation-induced thymine base damage in replicating
chromatin.
Radiat. Res. 90 , 556-574 (1982)

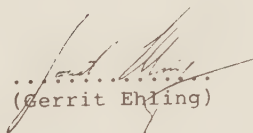
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Tempel für die Überlassung des Themas. Er hat diese Arbeit in allen Phasen mit Anregungen und uneingeschränkter Diskussionsbereitschaft fürsorglich betreut.

Nicht zuletzt ist es dem guten Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe Radiologie unter seiner Leitung zu verdanken, daß die vorliegende Arbeit in der Kürze der Zeit fertiggestellt werden konnte. Hier verdanke ich v.a. Herrn Dr. A. Spath neben den kritischen Anmerkungen die jederzeit gewährte freundschaftliche Unterstützung in die Einführung der Labormethoden sowie Ratschläge zur Durchführung der Analysen.

Frau H. Kortenbeutel möchte ich für ihre freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor und die stete Hilfsbereitschaft herzlich danken.

L e b e n s l a u f

Gerrit Ehling	geb. am 20. März 1959 in Hamburg
Eltern	Gerhard Ehling, Industriekaufmann Sieglinde Ehling, Hausfrau geb. Tiedemann
Schulbesuch	1966 - 1969 Hermanol-Volksschule 1969 - 1978 Felix-Klein-Gymnasium
Abitur	27. Mai 1978
Wehrdienst	02.01.79 - 31.03.80
Studium	Nov.1980 - Febr.1986 Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Staatsexamen	26. Februar 1986
Approbation	05. November 1986
Dissertation	seit April 1986


(Gerrit Ehling)

